

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___» _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: «Технологія виробництва вакцини БЦЖ. Дільниця виділення
продукту»**

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-62

Левковська Анна Валеріївна _____

Керівник:

Доцент кафедри промислової біотехнології, к.б.н.

Орябінська Лариса Борисівна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

Старший викладач кафедри біотехніки та інженерії, к.т.н.

Фесенко Сергій Вікторович _____

Рецензент:

Доцент кафедри екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н.

Козар Марина Юріївна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студентка _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП 6207. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	148	
3	A1	ДП 6207. 01.001 ТК ДП 6207. 01.002 ТК	Технологічна схема	2	
4	A1×2	ДП 6207. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП 6207. 03.000 ТК	Друк-фільтр	1	

				ДП 6207 00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата			
Розробн.	Левковська А.В.			Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Керівн.	Орябінська Л.Б.				1	1
Консульт.	Фесенко С.В.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62	
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

« 27 » лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Левковській Анні Валеріївні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва вакцини БЦЖ. Дільниця виділення продукту», керівник проєкту Орябінська Лариса Борисівна, к.б.н., доц., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с
2. Термін подання студентом проєкту _____
3. Вихідні дані до проєкту: російський субштам *Mycobacterium bovis* BCG-1; середовище культивування – модифіковане середовище Сотона; параметри культивування: $t = 38^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6,5$, $\tau = 7$ діб; спосіб очистки продукту – фільтрація; друк-фільтр для первинного очищення – об'єм $0,002 \text{ м}^3$; параметри фільтрації: $P = 0,3 \text{ МПа}$; кінцевий продукт – ліофілізована біомаса у ампулах шприцевого наповнення для фармацевтичної промисловості.
4. Зміст пояснювальної записки: обґрунтувати вибір та охарактеризувати продуцент для виробництва вакцини БЦЖ; розглянути методи створення атенуйованих штамів та обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні

характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну та апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції фільтру, здійснити технологічний, конструктивний розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду друк-фільтру – 1 арк. А1, технологічна схема – 2 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А 1×2.

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	28.02.20-23.03.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	24.03.20-03.04.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	04.04.20-13.04.20	
4.	Технологічна частина	13.04.20-23.04.20	
5.	Технологічна схема	13.04.20-23.04.20	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	23.04.20-30.05.20	
7.	Складання апаратурної схеми	23.04.20-15.05.20	
8.	Оформлення пояснювальної записки	30.05.20-02.06.20	
9.	Подання готової роботи на рецензію та до екзаменаційної комісії	02.06.20-08.06.20	

Студент

Анна ЛЕВКОВСЬКА

Керівник

Лариса ОРЯБІНСЬКА

**Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва вакцини БЦЖ.
Дільниця виділення продукту»**

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт «Технологія виробництва вакцини БЦЖ. Дільниця виділення продукту»: 150 с., 18 рис., 9 табл., 109 посилань.

Проєкт присвячений технології виробництва вакцини БЦЖ для щадної первинної імунізації. Готовий препарат використовується у якості протитуберкульозної профілактики для недоношених дітей або із вродженими порушеннями імунного захисту.

Як біологічний агент, обрано російський субштам *Mycobacterium bovis* BCG-1, базуючись на його реакто- та імуногенності. Було розглянуто основні морфологічні, фізіолого-біохімічні та культуральні особливості.

Відповідно до цього, запропоновано технологічну схему виробництва вакцини БЦЖ-М в ампулах шприцевого наповнення. Проведено аналіз можливої оптимізації поживного середовища для вирощування культури мікобактерій, що підвищуватиме вихід цільового продукту. Наведено обґрунтування методу отримання біомаси шляхом культивування у промислових колбах, що запобігатиме потраплянню некондиційного матеріалу у готовий продукт.

Обґрунтовано вибір апарата для процесу первинного очищення біомаси від середовища, який дозволить отримати чисту біомасу у межах масштабів виробництва. У роботі наведено технологічний і конструктивний розрахунки друк-фільтру, що підтверджують його надійність та працездатність. Проєкт містить обґрунтовані технологічну та апаратурну схеми виробництва, що дозволяють отримати препарат належної якості. Для кожної технологічної стадії наведено матеріальний баланс.

ВАКЦИНА, БЦЖ, НЕДОНОШЕНІ ДІТИ, МІКОБАКТЕРІЇ, MYCOBACTERIUM BOVIS, ТУБЕРКУЛЬОЗ, ПРОФІЛАКТИКА, ІМУНОГЕННІСТЬ, ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, ФІЛЬТРУВАННЯ.

					ДП 6207. 00.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Левкобська А.В.			РЕФЕРАТ		Літ.	Арк.
Перевір.		Орядінська Л.Б.						5
							150	
Керівн.		Орядінська Л.Б.					КПІ ім. Ігоря Сікорського	
Затверд.							ФБТ	

ABSTRACT

Diploma project «Technology of BCG vaccine producing. Area of the product separation»: 150 p., 18 Fig., 9 Tables, 109 references.

The project is devoted to the technology of BCG vaccine production for gentle primary immunization. The finished drug is used as anti-tuberculosis prophylaxis for premature infants or children with congenital immune disorders.

As a biological agent, the Russian substrain *Mycobacterium bovis* BCG-1 was chosen based on its reactogenicity and immunogenicity. The main morphological, physiological, biochemical, and cultural features were considered.

Accordingly, a technological scheme for the production of BCG-M vaccine in ampoules was proposed. The possible optimization of the nutrient medium for growing a culture of mycobacteria, which will increase the yield of the target product, was analyzed. The substantiation of the method of obtaining biomass by cultivation in industrial flasks is also given, which will reduce the risk of getting substandard material into the finished product.

The choice of the device for the process of primary purification of biomass from the medium, which will allow obtaining pure biomass within the scale of production, was substantiated. The technological, constructive calculations of the drook-filter, which confirm its reliability and efficiency, are given in the work. The project contains substantiated technological and hardware schemes of production, which allow obtaining the drug of proper quality. The project contains substantiated technological and hardware schemes of production. Material balance is given for each technological stage.

VACCINE, BCG, PREMATURE CHILDREN, MYCOBACTERIA, MYCOBACTERIUM BOVIS, TUBERCULOSIS, PREVENTION, IMMUNOGENICITY, MEDIUM, FILTRATION.

					ДП 6207. 00.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ABSTRACT	Літ.	Арк.	Аркушів
Разроб.		Левкоївська А.В.					6	150
Перевір.		Орядінська Л.Б.						
Керівн.		Орядінська Л.Б.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затверд.								

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО ПРОДУЦЕНТА.....	12
1.1. Основні промислові продуценти.....	12
1.2. Морфолого-цитологічні ознаки.....	15
1.3. Культуральні ознаки.....	17
1.4. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	20
1.5. Серологічні ознаки.....	24
1.6. Поширення в природі.....	27
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	31
2.1. Характеристика кінцевого продукту.....	31
2.2. Схема хімічних перетворень.....	32
2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	36
2.4. Методи очистки цільового продукту.....	39
2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	40
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	44
3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	44
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту.....	52
3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі.....	56
3.4. Особливості технології або апаратурного оформлення у зв'язку з використанням обраного продуцента.....	57
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	58
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	58

					ДП 6207. 00.000 ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Левкобська А.В.			ЗМІСТ			Літ.	Арк.	Аркушів	
Перевір.		Орядінська Л.Б.							7	150	
Керівн.		Орядінська Л.Б.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ			
Затверд.											

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	61
4.3. Опис технологічного процесу.....	65
4.4. Матеріальний баланс.....	97
4.5. Контроль виробництва.....	106
4.6. Технологічна схема виробництва.....	117
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	118
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	118
5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....	121
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання.....	132
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища	132
ВИСНОВКИ.....	135
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	137
ДОДАТКИ.....	149

ВСТУП

На разі Україна залишається членом списку країн, у яких епідемія туберкульозу є стабільною. Підтверджені випадки дають право посісти нашої країні у першій п'ятірці світу за розповсюдженням стійких форм туберкульозної інфекції. Єдиним методом боротьби з недугою і запобігання поширенню є імунізація туберкульозною вакциною [1].

Основою вакцини проти туберкульозу, або інша її назва – БЦЖ, – є атенуйовані мікобактерії бичачого туберкульозу – *Mycobacterium bovis*. Фіксовані дані вказують на існування близько 6 авірулентних субштамів, призначених для виробництва вакцин у всьому світі. Різниця між ними полягає у специфічній реактогенності, яка прямо залежить від антигенного складу. Саме цей показник дозволив у свій час розділити усі дочірні субштами, отримані від вперше атенуйованого у 1921 році А. Кальметтом та К. Гереном, на «ранні» та «пізні». Статистичні дослідження, проведені у різних країнах, зокрема і в Україні, які здійснювали перехід від вакцин на основі «ранніх» субштамів до таких на основі «пізніх» субштамів, показали різке підвищення випадків ускладнень серед дітей. Такі результати є базисом при виборі основного продуцента виробництва вакцини БЦЖ [2].

Сам процес атенуації для отримання вакцинного субштаму полягав у багаторазовому пасажуванні протягом років на середовищі, яке вважалось несприятливим для росту культури мікобактерій. З того часу не збереглися дані про те, що стало точною причиною генетичної зміни у вихідній культурі мікобактерій бичачого туберкульозу – кількість пересів чи компонентний склад середовища. На разі, інститути, на базах яких зберігаються музейні культури, дотримуються тактики збереження генетичної стабільності мікобактерій БЦЖ, уникаючи ризиків реверсії або подальших мутацій. Цього

					ДП 6207. 00.000 ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Левкоївська А.В.			ВСТУП		Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Орядінська Л.Б.						9	150
							КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівн.		Орядінська Л.Б.							
Затверд.									

ж дотримуються і виробничі установи, які займаються виробництвом вакцини, використовуючи для розмноження культури й отримання посівного матеріалу лише ті середовища, які є максимально наближеними до первинного [3].

Мікобактерії бичачого туберкульозу, як вид, належать до повільнозростаючих організмів. Дослідження підтверджують, що іноді їх первинний ріст спостерігається не раніше, ніж на 7 добу. Це є своєрідною перешкодою у промисловому виробництві, коли необхідно отримати достатню кількість матеріалу за короткий термін. Саме тому для розв'язання проблеми здійснюють оптимізацію вже відомих середовищ, проводячи заміни у компонентному складі. Попередньо дослідивши біохімічні властивості обраного субштаму продуценту, можна досягти збільшення кількості накопиченого цільового продукту у два рази. До того ж, підбір складових поживного середовища дозволяють зробити виробництво більш рентабельним [4].

У багатьох країнах світу однією із проблем є народження дітей недоношених, або таких, що мають вроджені імунні проблеми чи такі, що отримані під час пологів. Для таких випадків було запатентовано виробництво щадного препарату для первинної імунізації таких дітей – вакцину БЦЖ-М. Порівнюючи її зі стандартною вакциною, вона має значно меншу концентрацію клітин в одній дозі препарату. Це дозволяє знизити реактогенність вакцини зі збереженням її імуногенності. До того ж, відмінності є також у технологічному процесі виробництва. Зміни, які вводять на етапі культивування дозволяють розв'язати проблему потрапляння некондиційної продукції до вакцинного препарату, що може призвести до появи небажаних ускладнень у вигляді БЦЖ-лімфаденітів [5].

Метою дипломного проекту є дослідження особливостей технології виробництва вакцини БЦЖ-М на основі обраного вакцинного субштаму

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		10

мікобактерій. Для досягнення поставленої мети були представлені наступні завдання:

- Провести огляд субштамів БЦЖ існуючих препаратів протитуберкульозної вакцини, зокрема, що використовувались або використовуються нині в Україні, та обґрунтувати вибір продуцента із дослідженням його морфологічних, культуральних, фізико-хімічних та імунологічних особливостей;
- Надати характеристику кінцевого продукту – біомаси клітин – та біохімічних перетворень, що відбуваються у ході її накопичення;
- Здійснити огляд існуючих технологій отримання промислового продуцента та обґрунтувати їх вибір;
- Запропонувати можливі варіанти удосконалення технології виробництва препарату на основі біомаси мікобактерій;
- Скласти технологічну та апаратурну схеми виробництва із підбором обладнання та детальним описом проходження кожної стадії та операцій;
- Провести розрахунок апарату для відділення біомаси *M. bovis* BCG, який би задовольняв умови виробництва та матеріальний баланс, виконати креслення;
- Проаналізувати можливі рішення забезпечення вимог щодо охорони праці та навколишнього середовища у процесі виробництва вакцини БЦЖ-М.

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
						11
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Основні промислові продуценти

На сьогодні на меті медицини України стоїть одна із найважливіших проблем – боротьба з поширенням туберкульозу, стабільність епідемії якого підтверджується і нині. Відповідно до міжнародних стандартів наша країна належить до 27 країн світу, на які приходить 85% туберкульозного гніту та займає 4 місце у світі за розповсюдженням хімічно резистентних форм туберкульозу серед нових випадків захворювань.

В Україні, як і у всьому світі, поширеним методом боротьби із даним захворюванням серед дітей залишилась імунізація – спосіб підвищення стійкості здорової людини до туберкульозної інфекції. Проблемою введення вакцини, штаму ослаблених живих мікобактерій, є ускладнення, частота яких лежить у межах від 0,004% до 2,5%, і у деяких випадках навіть перевищує [1].

Туберкульоз – інфекційне захворювання, що супроводжується утворенням специфічних гранул у різних органах і тканинах (найчастіше у легенях) та поліморфізмом клінічної картини. Причиною є мікобактерії туберкульозу (МТБ), що відносяться до родини *Mycobacteriaceae*, що включає лише один рід – *Mycobacterium*. За прояв туберкульозу у людини відповідає *Mycobacterium tuberculosis*, в окремих випадках причиною можуть бути мікобактерії бичачого виду – *M. bovis*, що є патогенами рогатого скоту. Інші види мікобактерій відносяться до нетуберкульозних, або атипових, і можуть викликати мікобактеріози.

Природна резистентність при туберкульозі грає важливу роль, хоча вважається, що природного та трансплацентарного імунітету при туберкульозі не існує. Специфічна імунна відповідь формується після

					ДП 6207. 00.000 ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Левкобська А.В.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Орядінська Л.Б.						12	150
Керівн.		Орядінська Л.Б.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затверд.									

вакцинації БЦЖ або ж власне після інфікування МТБ, що може завершитись захворюванням. Такий процес, як вакцинація, уведений до календаря профілактичних щеплень майже 200 країн, ревакцинація проводиться у 59 з них [6].

Вакцина БЦЖ – це єдиний препарат, який застосовувався та застосовується нині як профілактика туберкульозу. Вона носить назву своїх розробників Alberta Calmette та Camille Guerin (BCG, Bacille Calmette-Guerin) та була отримана після проведення ними 231 пасажу патогенного штаму *Mycobacterium bovis* із метою зниження його вірулентності.

Культивування БЦЖ у лабораторних умовах інших країнах проводили на індивідуально підібраних середовищах, відповідно до встановлених регламентів, що призвело до отримання додаткових дочірніх штамів – субштамів, а саме: Pasteur 1173P2, Danish SSI, Glaxo 1077, Tokyo 172-1, Russia BCG-1, Moreau RDJ, Montreal, Tice субштам та інші [7].

За біохімічними показниками субштами БЦЖ сформовано у дві групи: до першої належать японський, бразильський та російський штами, які продукують білок вагою 23-кД, містять дві копії IS-фрагменту 986 та включають у себе метоксиміколат. До іншої групи потрапили пастерівський та датський штами, що містять лише одну копію інсерційного фрагменту 986, не продукують 23-кД білок, а також не містять метоксиміколату [2].

Клінічні дослідження показали відмінності субштамів у ступені активності розмноження та стійкості при потраплянні до організму хазяїна. Відмінності в індукції та персистенції відповідей БЦЖ-специфічної імунної системи можуть відіграти роль при виборі штаму для виготовлення вакцини. Так, штами Glaxo 1077, Pasteur 1173P2, Russia BCG-1 здатні до активного розмноження та збереження в організмі ще протягом 3 місяців, на відміну від японського штаму, що характеризувався швидким виведенням із селезінки у дослідних тварин. Аналіз цитотоксичної активності показав, що штами Pasteur 1173P2 та Russia BCG-1 викликали більш сильні відповіді

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

цитотоксичних Т-клітин, ніж штам Glaxo 1077. Показник імуногенності є важливим у розвитку ефективного рекомбінантного штаму БЦЖ шляхом експресії чужорідних генів. Але до нашого часу не було доведено те, що генетичні відмінності (що лежать в основі різниці імуногенності) між штамми БЦЖ корелюють ефективність або ступінь захисту. Існують лише результати досліджень щодо прояву побічних ефектів при вакцинації у японського та Glaxo-штамів: через відсутність здатності до продукування важливих факторів ліпідної вірулентності спостерігалось менше побічних проявів при клінічних дослідженнях [8, 9, 10].

Зростання побічних проявів після БЦЖ-вакцинації у деяких країнах спостерігалось при зміні вакцинального субштаму. До 2012 року у Європі, у тому числі й в Україні, у рівному співвідношенні використовувався як російський штам BCG-1, так і датський штам SSI 1331. Протягом 2012 -2013 років Європа повністю перейшла на використання лише датського штаму, що призвело до збільшення випадків БЦЖ-лімфаденітів (ускладнення після вакцинації) у десятки разів. У нашій країні використання останньої проходило з 2007 по 2013 років, але після численних досліджень вчені прийшли до висновку, що причиною росту випадків БЦЖ-лімфаденітів є висока реактогенність вакцини субштаму SSI 1331. З уведенням наказу про відмову від вакцини БЦЖ датського виробництва кількість ускладнень знизилось до 52 (0,14%) [11, 12].

Відповідно до статистичних даних Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), а саме їх бази даних щодо положення туберкульозу у світі – BCG Atlas – в Україні, як протитуберкульозну вакцину, з 2015 року використовують болгарську вакцину - субштам Sofie SL222 [13].

До моменту переходу на болгарську вакцину, а саме у 2013-2015 роках, Україну забезпечувала вакцинами Росія (субштам BCG-1). Відмова від російських вакцин, насамперед, пов'язана із ситуацією в Україні, а також у запобіганні виявленні невідповідності препарату нормам GMP [14].

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

На разі, відповідно і до даних Держлікслужби України, офіційно зареєстрованими вакцинами залишаються саме болгарського та датського виробництва. Дані 2018 року вказують на існування ще однієї вакцини, але за офіційними даними інформації немає, що можливо пов'язано із закупівлею вакцин приватними підприємствами [15, 16].

Болгарська, як і датська вакцина, відноситься до такої, що має у складі «сильний» субштам, який відрізняється більшою залишковою вірулентністю та високою захисною здатністю. Тобто є більш реактогенною, а тому може викликати поствакцинні ускладнення [17].

Враховуючи вказаний вище факт реактогенності болгарської вакцини, а також те, що її субштам Sofia SL222, будучи дочірнім від російського BCG-1, має з останнім повну генетичну ідентичність, варто зосередити увагу саме на технології виробництва вакцини на російському субштамі [18].

Систематичне положення досліджуваного мікроорганізму по Берджі наступне [4]:

- Царство Прокаріот
- Підцарство – інформація відсутня
- Категорія – Грампозитивні еубактерії, що мають клітинну стінку
- Група - Мікобактерії
- Підгрупа - відсутня
- Род *Mycobacterium*
- Вид *Mycobacterium bovis*
- Штам *Mycobacterium bovis* BCG-1 (Russia)

1.2. Морфолого-цитологічні ознаки

На рівні субштамів виду *Mycobacterium bovis* не здійснюють проведення морфологічних описів, оскільки усі вони, а їх зареєстровано офіційно 16, мають відмінності на генетичному рівні, що веде за собою

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

відмінності в імуногенних характеристиках, результатах серологічних тестів [6].

Саме тому обраний продуцент, *M. bovis* BCG-1 – авірулентний вакцинний субштам, відповідно до родової морфології, має вигляд нерухомих, неспороутворюючих паличкоподібних бактерій розміром 0,2-0,7 × 1,0-10 мкм (товстіші та коротші, у порівнянні з *M. tuberculosis*), що мають схильність до утворення гіллястих структур, які спостерігаються у період інтенсивного росту і розмноження клітин та легко розпадаються. У процесі розвитку можуть набувати увігнутої форми (Рис. 1.1). За несприятливих умов, внаслідок голодування чи кріогенного впливу, утворюють коккоподібні L-форми. Добре помітних повітряних гіфів не утворюють. Конідії та капсули відсутні, не мають джгутиків. У цитоплазмі наявні кислотолабільні гранули, що складаються із метафосфату (зерна Муха) [4, 19, 20]

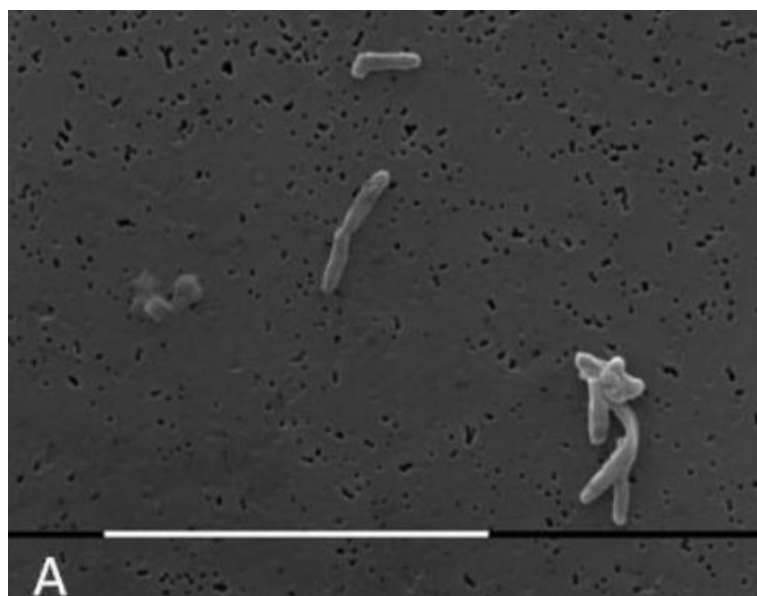


Рисунок 1.1. Знімок електронного мікроскопу бактеріальних клітин *M. bovis* BCG-1 [19]

Клітинна стінка мікобактерії має будову і хімічний склад, характерний для грампозитивних бактерій, але через високий вміст ліпідів за Грамом зафарбовується важко, і прояв ознак Г⁺-бактерій слабкий [4, 20].

Метод флюорохромного зафарбовування вказує на наявність міколової кислоти — виключно компоненту клітинної стінки мікобактерії, представленого у вигляді вільних сульфоліпідів та корд-фактору, який виконує захисну функцію, роблячи поверхню мікобактерій воскоподібною та сильно гідрофобною. Ця складова зв'язується із флуоресцентними барвниками (зокрема аурамін-родаміном), які у свою чергу поглинають ультрафіолетові промені та випромінюють світло певної довжини (Рис. 1.2) [19, 20].

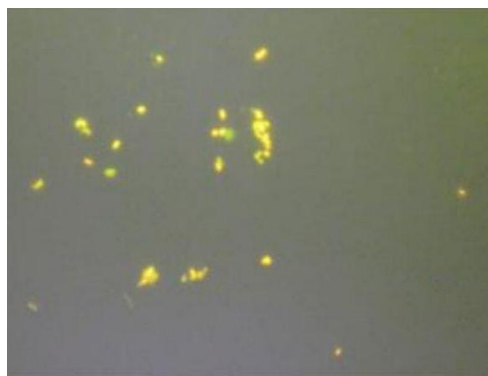


Рисунок 1.2. Флуоресцентна мікроскопія з аурамін-родаміном [19]

Бактерії є кислото- та спиртостійкими на певних стадіях росту, що визначається методом Циля-Нільсона, і забезпечує їх виявлення серед інших паличкоподібних бактерій (Рис. 1.3) [4].

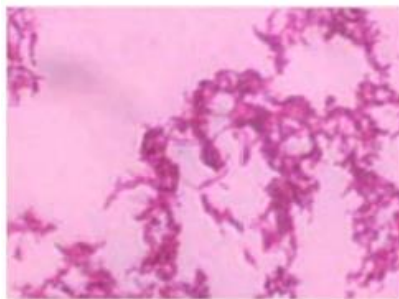


Рисунок 1.3. Мікроскопічний вигляд мікобактеріальної культури *M.bovis* BCG-1. Забарвлення методом Циля-Нільсона. Збільшення 1000^x [21]

1.3. Культуральні ознаки

Перші організми БЦЖ, отримані вже вказаними вище вченими, були культивовані на поживному середовищі на основі гліцеринової картоплі та

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

агатового розчину, що давало «суху, щільну скручену масу, яку було важко гомогенізувати». Подальша зміна середовища, включення до нього бичачої жовчі, змінила культуральні характеристики, так вдалось отримати вперше «гладку, склоподібну, пастоподібну бактеріальну масу» [2].

Вид *M. bovis* належить до повільнозростаючих представників мікобактерій: при оптимальній температурі, багатому середовищі та використанні дуже розведеного посівного матеріалу утворюють колонії не менше, ніж через 7 діб. Характер росту пов'язаний з вираженою гідрофобністю внаслідок великої кількості ліпідів в клітинній стінці [4].

Вважається, що на щільних середовищах даний вид мікобактерій утворює дрібні, гладкі колонії, кольору слонової кістки, з інколи сіруватим зморщуватим нальотом (Рис. 1.4). [20]

Але варто зазначити, що в опрацьованих джерелах прояв культуральних ознак, залежно від середовища, дещо відрізняється. Існують декілька поширених щільних середовищ для культивування мікобактерій БЦЖ, що складаються із яєчної маси та сольової основи, це зокрема середовище Мордовського, середовище Левенштейна-Йенсена, середовище Гельберга, а також гліколове синтетичне середовище ВКЛ (середовище Вакенгут, Козловської та Лещинської). Окремі характеристики представлені у таблиці (Табл.1.1) [20, 22].

Насамперед, на вид колоній впливає саме вміст солей, так при зменшенні кількості солей, колонії можуть бути напівпрозорими, а мікроскопічне дослідження вказувати на формування мікобактерій коккоподібних, потовщених форм [27].



Рисунок 1.4. Культура *Mycobacterium bovis*. Середовище Гельберга [23]

Таблиця 1.1

Культуральні ознаки *M. bovis* відповідно до середовища культивування

Тип середовища культивування	Культуральні ознаки
Середовище Мордовського	Матові колонії кольору слонової кістки, із горбистою поверхнею, краї нерівні (R-форми) [21]
Середовище ВКЛ	Окремі дрібні колонії, сухі, кольору слонової кістки, утворюють плівку на поверхні середовища у вигляді зморшкуватої, щільної маси блідо-рожевого кольору [24]
Середовище Ленштейна-Йенсена	Шорсткувата щільна колонія, від 0,5-8,0 мм у діаметрі, жовтуватого кольору з тонкими нерівними краями [25]
Середовище Гельберга	Дрібні та середні колонії кольору слонової кістки, шорсткуваті (R-форми) [26]

1.4. Фізіолого-біохімічні ознаки

Для дослідження мікобактерій, зокрема обраного продуцента, у зв'язку з їх повільним зростанням, необхідно застосовувати спеціальні методи та спеціальні середовища. *M. bovis* патогенний штам, що відноситься до obligatних паразитів хордових [4].

Біохімічні тести у наш час використовуються у якості методу для ідентифікації видів бактерій. Біохімічні властивості у межах роду, виду дещо відрізняються, саме для цього проводять наступні тести: ніациновий тест, тест на редукцію нітратів, розщеплення сечовини, нікотинаміду, гідроліз твіну-80 та інші [28].

Дослідження 2008 року, проведені для різних субштамів БЦЖ, показали наступні результати для досліджуваного (BCG-1) (Табл. 1.2) [29].

Таблиця 1.2

Результати біохімічних тестів субштаму BCG-1

Біохімічний тест	Результати для субштаму <i>M. bovis</i> BCG-1
Нітратредуктазна активність	±
Ніациновий тест	+
Гідроліз твін-80	-
Наявність уреаз	+
Піразинамідазна активність (результат спостерігали на 4 та 7 дні)	Відсутній позитивний результат на 4 та на 7 дні
Розклад <i>p</i> -аміносалицилату	-
Стійкість до тіофен-2-каргідразиду карбоксилової кислоти (використовували різні концентрації: 1 мг/мл та 10 мг/мл)	Стійкість при концентрації 1 мг/мл

Тест на каталазну активність (при кімнатній температурі)	Розміри колонії: 9,3×2,4 мм Показник активності: низький
Пероксидазна (H ₂ O ₂) стійкість	+
Стійкість до монооксиду нітрогену (NO)	-

Відповідно до цього, можна зробити висновок про характеристику біохімічних властивостей субштаму:

- нітратредуктазна активність свідчить про здатність клітини мікобактерії до внутрішньоклітинного «виживання», можливість редукувати нітрати у нітрити;
- позитивний результат ніацинового тесту вказує на здатність до синтезу та накопичення цієї похідної нікотинової кислоти, що приймає участь в окисно-відновних реакціях;.
- нездатність гідролізувати твін-80 свідчить про відсутність мікобактеріальної фосфоліпази А, яка власне каталізує гідроліз ліпідів і забезпечує використання цієї жирної кислоти у якості джерела вуглецю;
- результати тесту на каталазну активність вказують, що вміст каталази у бактерій субштаму низький;
- позитивний результат у тесті на стійкість до пероксидазного впливу пов'язаний зі здатністю субштаму бактерій протидіяти окисному стресу клітини хазяїна (щляхом каталазної активності, хоча і низької);
- здатність до виділення ферменту уреазі (забезпечує розщеплення вуглеводів);
- відсутня стійкість до можливої негативної дії нітрозативного стресу (негативної дії NO) [27].

Аналізуючи склад поживних середовищ, вказаних у попередньому пункті, основним джерелом вуглецевого живлення є гліцерин. Вибіркове

відношення до гліцерину пов'язують з утворенням жирів та восків – існує кореляція між вмістом гліцерину у поживному середовищі та відсотком жиру в клітинах мікобактерій. Найбільш оптимальним вмістом гліцерину у середовищі вважають 7,5% від об'єму. Проведені дослідження по заміні такого джерела вуглецю у середовищі на рідкі парафіни показали позитивні результати у рості мікобактерій – утворення біомаси відбувалось у 6-7 разів швидше [30, 31].

Крім цього, важливі вуглеводи – арабіноза, маноза і мальтоза – складають більшу частину усіх сахаридів. Деякі інші сахариди, як трегалоза, глюкоза, рамноза та інші, відіграють роль у життєдіяльності клітини. При цьому, синтез здійснюється по гідролазному й альдолазному шляхах. Піруватний шлях використовується для синтезу глікогену. Для отримання енергії використовується пентозофосфатний шлях окиснення глюкози. Він забезпечується малат-, ізоцитрат – та сукцинатдегідрогеназами. Унікальним є і гліюксалатний шлях – цей цикл дуже часто досліджують на зв'язок із механізмом хемотаксису мікобактерій під час персистенції [32].

Мікобактерії не синтезують протеолітичних ферментів, тому не гідролізують білки та не пептонізують желатин. Вважають, що чим більше гідролізований білок, тим легше протікатиме асиміляція продуктів його розпаду мікобактеріями. До того ж, іон амонію – достатнє джерело азоту для них, хоча у багатьох середовищах, зокрема Левенштейна-Йенсена та Фінна-П, використовуються більш складні та дорожчі джерела азоту – аспарагін та глютамат натрію відповідно. Використання амонію необхідне для синтезу амінокислот, пуринових та піримідинових основ.

Використання середовищ на яєчних масах забезпечуватиме мікобактерії ростовими факторами. Звичайно, лабораторні штами, у тому числі і BCG-1, здатні до розвитку на синтетичних середовищах, але при наявності фракцій яєчного жовтка їх ріст значно підвищується, хоча і

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

спостерігається низький ріст у перших генераціях мікобактерій (зокрема через відсутність потреби синтезу лецитинази в організмі хазяїна).

Важливим для росту мікобактерій вважають мінеральний обмін – для нормального росту їм необхідний калій, магній, фосфор та сірка. Вважають, що значно перевищує потреба в фосфорі, ніж в інших мікроелементах. Це пояснюється тим, що фосфор приймає участь у вуглеводневому обміні. Високий вихід мікобактерій отримали на середовищі, що містить не менше 300 мг/% фосфору, 10 мг% сірки, 2,5 мг% хлористого магнію.

При визначенні оптимального середовища для індикації мікобактерій виникають певні труднощі, бо вони мало відрізняються за хімічним складом [30].

Проведені дослідження для субштаму BCG-1 показали наступний результат щодо оптимального значення рН середовища: межі, при яких наявний ріст бактерій даного субштаму 6,2-10, але $pH_{opt}=6,6$ [27].

Вважається, що температурний діапазон для росту мікобактерій 30-42°C, при цьому оптимум температури для вирощування субштамів *M. bovis* складає 37°C. [17, 20]

По відношенню до кисню мікобактерії бичачого туберкульозу, як і інші представники роду, є аеробами, які здатні рости у факультативно-аеробних умовах. Зокрема, їх ріст можливий не тільки на поверхні щільного середовища, а й у рідкому середовищі. За несприятливих умов або недостатній концентрації кисню мікобактерії проявляють себе як мікроаерофіли або навіть анаероби (але при цьому відбуваються зміни в обміні речовин – стимулюються азидні сполуки, які знижують процеси окиснення пірувату або трегалози) [32, 33].

За споживанням кисню і розвиненістю оксидазних систем мікобактерії схожі до істинних грибів. У якості зв'язуючого елементу між НАДН-дегідрогеназою та цитохромом b у системі переносу роду *Mycobacterium* слугує вітамін K₉. Ця система цитохромів схожа до мітохондріальної. Проте

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		23

такий тип дихання не є єдиним джерелом АТФ. Крім O_2 -термінальної, мікобактерії здатні використовувати дихальні ланцюги, у яких перенесення електронів закінчується нітратами (NO_3^-). Резервом дихальної системи слугує гліоксалатний шлях [33].

Техніка розпізнавання субштамів мікобактерій БЦЖ фаготипуванням дає інформацію, про відношення їх до впливу бактеріофагу. Результати проведеного дослідження показали, що російський субштам БЦЖ був чутливим до лізису фагу DS6A, і більшою мірою до бактеріофагу GS4E, при використанні 12 видів бактеріофагів; необхідно врахувати і те, що DS6A –фаг є найбільш специфічним літичним вірусом, що інфікує весь комплекс мікобактерій туберкульозу [34].

Щодо впливу макрофагів безпосередньо в організмі людини, то субштам BCG-1 показав властивість виживати у макрофагу та організмі хазяїна в цілому, зокрема це може бути пов'язано із біохімічною властивістю мікобактерії, а саме здатністю до накопичення ніацину [29].

1.5. Серологічні ознаки

Серологічні властивості мікроорганізму базуються на його імуногенній та алергенній здатності, а самі серологічні дослідження дозволяють встановити антигенний склад мікроорганізму.

Вакцина БЦЖ, за класифікацією, є живою антибактеріальною вакциною, що складається з атенуйованного збудника хвороби туберкульозу. Метою вакцини є викликати імунну відповідь (або імунну перебудову) організму при потраплянні всередину, тобто вона повинна мати імуногенні властивості. Зокрема через наявності відповідних антигенів – білкових речовин, що несуть ознаки генетично чужорідної інформації та взаємодіють з лімфоцитами та антитілами [17].

Імунна відповідь проти туберкульозу покладається на Т-клітини, тому захисні вакцини потребують індукції антигенспецифічних Т-клітин через

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		24

мікобактеріальні секреторні антигени – імуногенні білки. При цьому, домінуючими Т-клітинними антигенами повинні бути ті, що складають основну частину туберкульозо-специфічних Т-клітин або клонів Т-клітин пам'яті, яких виявляють в інфікованих людей [35, 36].

Ефективність препарату більшою мірою може бути забезпечена великою кількістю презентуємих епітопів. Множинні епітопи можуть займати більшу частину антигенного білку, що сприятиме антигенпрезентуючим клітинам різних гаплотипів людських лейкоцитарних антигенів (HLA) у відповідь на імуногенність одного чи декількох епітопів одного і того ж антигену. Сюди належать мікобактеріальні антигени: Ag85A, ESAT-6, Ag85B, MPT64 і hsp70 [36].

У процесі розробок, деякі дочірні субштами втратили геномні ділянки, що впливають на їх антигенний вміст, потенційно змінюючи захисну ефективність. Так, втрата локусу RD₁ у всіх, зокрема і російського, субштамів, впливає на шлях секреції білка ESX-1, що забезпечує у дикому штамі перенесення факторів вірулентності. Також, у зв'язку з делецією неможливе секретування антигенів ESAT-6 та CPF-10. Саме тому вакцина з ослабленою вірулентністю. Так, відомо, що ESAT-6 є сильним антигеном, що може спричиняти критичні запальні процеси в організмів хазяїна, що не є бажаним при використанні вакцини [37, 38, 39].

Також делеція 103 бп, наявна у всіх субштамах вакцини, усуває дистальний кінець hspR, що бере участь у регуляції транскрипції білків теплового шоку, і як відомо, впливає на вірулентність. Після видалення субштами демонстрували ослаблений ріст хронічної інфекції [37].

Все ж у ранніх штамі, до яких відноситься і російський субштам BCG-1, залишилась ділянка RD₂, на відміну від пізніх штамі, до яких належить зокрема і датський субштам. Саме така відмінність і пов'язана із тим, що вакцина на датському субштамі належить до сильних вакцин, адже вона спричиняє вироблення більшої кількості поліфункціональних клітин CD4⁺ Т.

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

Крім цього ділянка RD₂ забезпечує секретування імуногенного білка MPB64, коли ж антиген MPT64 який характерний для збудника туберкульозу людини *M. tuberculosis*, відсутній у вакцинних субштамів *Mycobacterium bovis*. MPB64 (26 кДа), як антиген, належить до числа основних секреторних білків і є одним із домінантних Т-клітинних антигенів людини [36, 37].

Також, у порівнянні з пізніми штамми, *M. bovis* BCG-1 містить антигенну область, яка кодує секретування MPB70 та MPB83 імуногенних білків. Це тісноспоріднені антигени, але MPB70 є розчинним антигеном, що секретується, а MPB83 – експортованим ліпопротеїном, пов'язаним із поверхнею бактерій. Вони мають значний потенціал для поліпшення діагностичних тестів на туберкульоз. До того ж MPB70 є важливим цільовим антигеном гуморальних та клітинних імунних реакцій. Обидва антигени сприяють виробленню в організмі моноклональних антитіл [37, 40].

Комплекс антигенів зовнішньої клітинної стінки Ag85 (А, В і С, 30-32 кДа) є основними білками, що секретуються. Ці антигени висококонсервативні. Їх функція полягає у зв'язуванні з фібронектином, і таким чином, вони беруть участь у фагоцитарному процесі макрофагів. У експериментальних моделях Ag85А і Ag85В належать до числа антигенів, що стимулюють Т-клітини пам'яті. Ці антигени стимулюють також сильну відповідь CD4⁺ і CD8⁺ Т-клітин людини, розпізнаються Т-лімфоцитами, що забезпечує вироблення IL-2 та INF-γ. Ag85В містить множинні Т-клітинні епітопи людини, які розсіюються по всьому білку, та декілька різнорідних епітопів, які можуть стимулювати Т-клітини за допомогою несумісних з HLA-DR антигенпрезентуючих клітин [36].

Щодо алергенності вакцинного препарату. Проведений моніторинг ускладнень вакцинацій у 2004-2007 роках показали, що жодної алергічної реакції, як відповідь на введення вакцини БЦЖ, не було виявлено (на відміну від виявлених оститів та лімфаденітів). Алергічна реактивність, як така, пов'язана із синтезом антитіл класу IgE, або ж ефektorних лімфоцитів

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		26

(гіперчутливість сповільненого типу). Відповідно до гіпотез та результатів досліджень, вакцина БЦЖ має неспецифічний, але позитивний, вплив на алергічні реакції. Дослідження із проведенням туберкулінового тесту показали, що введення вакцини БЦЖ в організм суттєво знижує рівень імуноглобуліну Е у сироватці крові, зі зсувом цитокінового профілю Th1 [41, 42].

Антигени вакцинних субштамів БЦЖ не пов'язані зі стимуляцією синтезу IgE, а будь-який можливий прояв алергії, як то атопічного дерматиту, може бути пов'язаний зі спадковою схильністю до посиленого утворення цього класу антитіл. До того ж, у разі завчасного виявлення в організмі протікання алергічної реакції, вакцинацію не рекомендують проводити, оскільки можливе інфікування з метою підсилення імунітету, може посилити прояв алергії [41].

1.6. Поширення у природі

У зв'язку з міграцією мікобактерій в антропогенній і дикій фауні, функціонуванням трофічних зв'язків на різних рівнях біоценозу – від трав'янистих до хижаків, птахів, безхребетних, і як наслідок, в абіотичне середовище, їх стали виділяти із ґрунту, деяких водойм і т.д. Так, хворі на туберкульоз тварини заражаються, перш за все, через контакт з ґрунтом територій ферм та пасовищ, а також через підстилки у приміщеннях.

Збудниками інфекційних захворювань, упродовж еволюції, була набута здатність виділятися з організму зараженого хазяїна, щоб не завершити існування разом із хворим організмом, та перейти до іншого, щоб паразитувати у ньому. Саме так забезпечується здатність зберігати життєдіяльність виду патогенним мікроорганізмом [43].

Як зазначалось раніше, *M. bovis*, як вид, належить до облігатних паразитів. Патогенні мікобактерії досліджуваного виду були знайдені у природі на траві пасовищ, заражених фекаліями хворої на туберкульоз

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		27

великої рогатої худоби, а також у ґрунті пасовищ. Саме у такому середовищі для *Mycobacterium bovis* характерна широка екологічна валентність – високий ступінь здатності адаптуватись до змін окремих, чи у комплексі, факторів середовища. У звичайних умовах на пасовищі, даний вид бактерій здатний виживати близько 2-х років і зберігати вірулентність до року [27, 43].

Через можливість трансмісивного шляху передачі мікобактерій, останні стали використовувати у якості екологічної ніші безхребетних, зокрема дощових черв'яків та личинок травневого хруща. Існує також можливість зберігатись та залишатись вірулентними і в організмі кліщів, що пов'язано із переходом через усі фази розвитку у процесі метаморфозу [44].

Патогенні мікобактерії були виявлені також і у проточних та непроточних водоймах. Саме зоопланктон та бентосні тварини забезпечують циркуляцію патогенного мікроорганізму у водній екосистемі та підтримання навіть на вищому рівні, ніж у ґрунті. Личинки кровосисних комах розвиваються у водоймах, часто розміщених недалеко від тваринницьких приміщень та на пасовищах, а здатність атипових мікобактерій існувати усередині цих організмів робить можливим подальше зараження представників великої рогатої худоби (і не тільки) через воду [44, 45].

Можна сказати, що мікобактерії здатні існувати у різних середовищах, адже завжди є можливість міграції від організму до організму паразитуючи, зберігаючи життєдіяльність та вірулентність.

Незвичайний хімічний склад і особливості структури мікобактерій зумовлюють високу стійкість до умов навколишнього середовища, фізичних і хімічних факторів, дезінфектантів [46]

Щільна клітинна стінка мікобактерій бичачого туберкульозу є стійкою до дії ультрафіолетових променів, що зазвичай пригнічують дію мікроорганізмів через фотохімічний ефект проти нуклеїнових кислот. Саме це дозволяє виживати бактеріям у ґрунті та фекаліях, при сильному, так при слабкому проникненні ультрафіолетових променів. Так, інактивації не

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		28

спостерігалось на глибині у 5 см в тіні протягом 2-х років, та на сонці на глибині в 1 см до 2-х місяців [27].

Вже описані вище міколові кислоти, які надають гідрофобності мікобактеріям, забезпечують стійкість до розчинених у воді водойм активних речовин. А можливість зміни складу жирних кислот, що входять до складу ліпідів, підвищує здатність бактерій адаптуватись до температурних змін. Так, мікобактерії бичачого туберкульозу зберігали свою життєздатність при температурі у 5°C протягом 6-9 місяців (залежно від стерильності умов), а також протягом 40 хв в умовах пастеризації молока при 85°C. Дослідження проведені за різних умов, при різних підвищених температурах підтвердили, що мікобактерії туберкульозного комплексу належать до евритермних патогенних мікроорганізмів [27].

Кислотність середовища у діапазоні рН 3,8-4,2 не впливала на вірулентні властивості мікобактерій туберкульозу, але лужна реакція при рН вище 8,0 викликала появу змінених форм.

Антагоністична дія мікрофлори природних об'єктів діє на мікобактерії постійно, але вони мають стійкість до антибіотичних речовин, що можуть виділятись іншими бактеріями. При дослідженні даного питання було виділено з одного зразка ґрунту (за умови розгляду тисячі) лише одного антагоніста – продуцента стрептоміцину.

Дослідження впливу фітонцидів на мікобактерії, показали, що соки багатьох рослин і їх ризосферна мікрофлора пригнічували життєдіяльність мікобактерій туберкульозу. Це зокрема може бути пов'язано зі збільшенням кількості мікроорганізмів ризосфери та підвищенні їх біохімічної активності, адже деякі сапрофітні мікроорганізми здатні розщеплювати ліпіди мікобактерій [27].

Адаптація до впливу несприятливих факторів також проявляється у здатності мікобактерій туберкульозного комплексу, і не тільки, утворювати

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

L-форми – набувати сферичної форми, вкритої цитоплазматичною мембраною [45].

У такому вигляді бактерії проявляють низьку метаболітичну активність, яка в першу чергу, направлена на потовщення клітинної стінки та позаклітинного матриксу, який перешкоджає дифузії речовин. У цей період також відбувається накопичення генетичного матеріалу, який дозволяє збільшити ймовірність відтворення клітини, які нормально функціонують, при настанні сприятливих умов [32].

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
						30
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Характеристика кінцевого продукту

Відповідно до інформації Фармакопейної статті ФС.3.3.1.0018.15, кінцевий продукт – вакцина туберкульозна БЦЖ ліофілізована (жива) – складається з мікобактерій вакцинного штаму *Mycobacterium bovis*, субштаму BCG-1, ліофілізованих у 1,5% розчині стабілізатора – глутамату натрію моногідрату.

Вона призначена для того, щоб викликати імунну відповідь при введенні в організм, – тобто для специфічної профілактики туберкульозу.

Кількість мікробних клітин БЦЖ і глутамату натрію моногідрату у дозі вказують в нормативній документації, але в загальному не менше 10 млн. життєздатних клітин БЦЖ в 1 мг. При мікроскопії мазків, забарвлених за Цілем-Нільсоном, повинні визначатись забарвлені у червоний колір (кислотостійкі) тонкі, прямі або злегка зігнуті палички довжиною 1-4 мкм і довжиною 0,3-0,5 мкм, часто з невеликими здуттями на кінцях, що не утворюють спор і капсул (що і відповідає звичайним морфологічним характеристикам даного виду і субштаму бактерій).

Вакцину випускають у комплекті з розчинником – 0,9% розчином натрію хлориду для ін'єкцій.

За описом, вакцина БЦЖ представлена пористою масою, порошкоподібною або у вигляді тонкої ажурної таблетки білого або світло-жовтого кольору, яка легко відділяється від днища ампули чи флакону. За фізичними показниками є гігроскопічною, а також нестійкою до впливу прямих сонячних чи ультрафіолетових променів.

Виробництво вакцини базується на системі посівного матеріалу – ліофілізату субштаму *M. bovis* BCG-1 із колекції патогенних мікроорганізмів.

					ДП 6207. 00.000 ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Левкоївська А.В.			РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА		Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Орядінська Л.Б.						31	150
							КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівн.		Орядінська Л.Б.							
Затверд.									

Чергова посівна серія вакцинного штаму повинна виготовлятися із найбільш ранньої серії (первинної чи вторинної посівної серії) [25].

2.2. Схема хімічних перетворень

Цільовим продуктом даного технологічного процесу є бактеріальна біомаса ослабленого субштаму *M. bovis* BCG-1.

Мікобактерії вирощують на рідкому середовищі Сотона у спеціальних міскостях. Відповідно до оптимальної температури, ріст біомаси здійснюють при 37°C. Як вже було вказано, для отримання біомаси для виробництва вакцини використовують готовий посівний матеріал, що не містить сторонньої мікрофлори, наділений високою захисною здатністю, і витримувався у відповідних умовах.

Готовий посівний матеріал (інокулят), вирощений у колбах Фернбаха протягом 13 діб, який подається на поживне середовище, продовжує ріст – затрачається приблизно 164-170 год [17].

Як вже було вказано раніше, розмноження досліджуваного виду бактерій відбувається досить повільно, навіть при інтенсивному перемішуванні. Припускають, що це може бути генетично детерміновано і пов'язано з тим, наскільки мікобактерії специфічно влаштовані. Зокрема, повільнозростаючі мікобактерії, до яких і належить досліджуваний штам, містять по одній копії оперону рибосомальної рибонуклеїнової кислоти (рРНК), у порівнянні з більшістю інших бактерій. Повільний ріст також є наслідком гідрофобної поверхні клітинної стінки - через великий вміст ліпідів (близько 60%) ускладнюється транспорт поживних речовин через бактеріальну мембрану. У такому разі саме додавання гліцерину до поживного середовища (зокрема, наявний у середовищі Сотона) сприяє росту клітин – молекули гліцерину можуть напряду дифундувати через ліпідні мембрани, тому швидкість надходження їх пасивною дифузією є достатньою

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		32

для нормального росту мікобактерій. У присутності гліцерину відбувається утворення надлишку ліпідів та полісахаридів, що є важливим при накопиченні біомаси [32].

Гліцерин, що потрапляє до клітини, шляхом фосфорилування гліцеринкіназою перетворюється у гліцерин-3-фосфат, що окислюється до проміжної сполуки дигідроксиацетонфосфату – цей тріозофосфат далі метаболізується через основні метаболітичні шляхи до глюкози та пірувату (Рис. 2.1). [48]

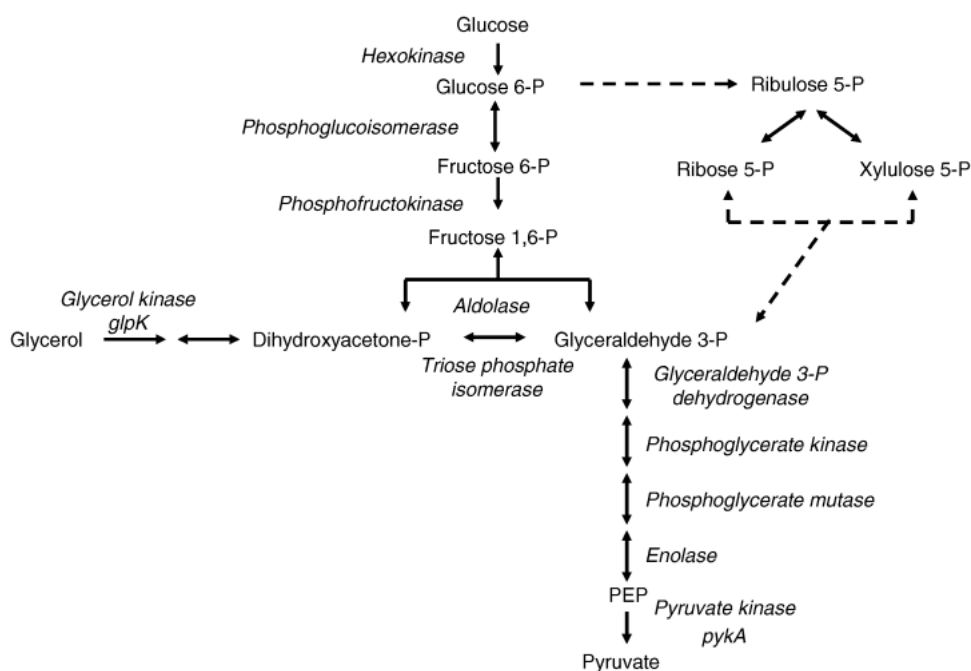


Рисунок 2.1. Гліколіз, пентозо-фосфатний шлях і катаболізм гліцерину. Штрихові стрілки вказують на безліч ферментативних реакцій на шляху пентозо-фосфату [49]

Не менше 70% утвореної з гліцерину глюкози направляється на зброджування по шляху Ембдена-Мейергофа-Парнаса, інші 30% - за пентозофосфатним шляхом з утворенням C₅- та C₄-цукрів. Інших шляхів для катаболізму глюкози у патогенних мікобактерій не існує [48].

Метаболітичний шлях дисиміляції пірувату здійснюється в основному через цикл Кребса (цикл трикарбонових кислот). Саме він відіграє важливу

роль у клітинному метаболізмі, забезпечуючи утворення біосинтетичних попередників для ліпідів, амінокислот. Відмінна особливість *M. bovis* BCG – знижена активність α -кетоглутаратдегідрогенази. Саме це стимулює появу також альтернативного проходження ЦТК зокрема при зниженому вмісті кисню. При цьому зупиняється окислювальна гілка на етапі утворення α -кетоглутарату, тоді як відновна гілка призводить до утворення сукцинату через включення янтарного напівальдегіду [50].

Існування анаплеротичних реакцій – гліоксалатного шунту – дозволяє жирним кислотам включатись у цикл трикарбонових кислот. Це є необхідною умовою для подальшого синтезу ліпополісахаридів із короткими аліфатичними ланцюгами, що важливо при формуванні клітинних стінок у молодих мікобактеріальних клітин та подальшого утворення високомолекулярних ліпідів [51].

Додавання детергенту твіну-8 повинно бути обмежене, адже він слугуватиме очевидним інгібітором росту мікобактерій даного штаму при високих концентраціях, адже, як було вже вказано раніше, *M. bovis* BCG-1 не здатний до гідролізу цієї жирної кислоти. До того ж, вакцинні штами були адаптовані до наявності одного джерела вуглецю, шляхом постійного вирощування *in vitro* на таких середовищах [52].

Загалом метаболітичний шлях перетворення джерела вуглецю можна подати у наведеній схемі у додатку (Додаток А).

Стандартне середовище Сотона характеризується наявністю L-аспарагіну як джерела азоту для мікобактерій, що культивуються. Наявність мембранного транспортера AnsP2 дозволяє захоплювати молекули цієї амінокислоти з подальшим переносом усередину клітини для перетворення. Асиміляція L-аспарагіну здійснюється аспарагіназами, які гідролізують цю амінокислоту до аспартату та аміаку. Це дозволяє надалі включити азот у

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		34

метаболіти – глутамат і глутамін (що не спостерігається за умови низького рН середовища) (Рис. 2.2)

Система перетворення аспарагіну підтримує ріст мікобактерій у кислих умовах шляхом виділення ними аміаку та буферизації рН. Але амінокислота L-аспарагін не слугуватиме підтримкою росту мікобактерій у випадку, коли вона є єдиним джерелом вуглецю та енергії [53].

Можлива заміна джерела нітрогену, зокрема на інші амінокислоти, з метою здешевити середовище, може тільки несприятливо позначитись на рості та розмноженні мікобактерій. Зокрема, використання у середовищі таких амінокислот, як L-серину чи L(D)-аланіну, призводить до інгібування росту субштаму BCG-1 навіть при наявності додаткового джерела азоту (наприклад, амоній хлориду). Це пов'язано із відсутністю функціональних L-аланіндегідрогенази та L-сериндеамінази. Також інгібування росту відбувається через блокування глутамінсинтетази аланіном та серином [54].

Потреба у високих початкових концентраціях компонентів середовища наявна через те, що транспорт поживних речовин до межі поділу мікроорганізм/середовище відбувається шляхом молекулярної дифузії, яка, у свою чергу, залежить від градієнта концентрації. Проте постійне перемішування значно полегшує процес транспортування. Надмірна присутність певних компонентів середовища може призводити до інгібування росту бактерій.

Співвідношення низької та високої концентрацій гліцерину та L-аспарагіну (як джерела азоту) відповідно сприяє максимальній продуктивності сухої біомаси, але не максимальній продуктивності КУО. Саме тому, для виробництва вакцинного препарату необхідне мінімальне співвідношення початкових концентрацій джерел вуглецю та азоту у середовищі. У такому випадку спостерігають найкраще значення

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		35

продуктивності КУО ($P_{CFU}=2,68 \cdot 10^6$ КУО/мг/добу), а середнє споживання складає 50 та 26% L-аспарагіну та гліцерину відповідно [17, 52]

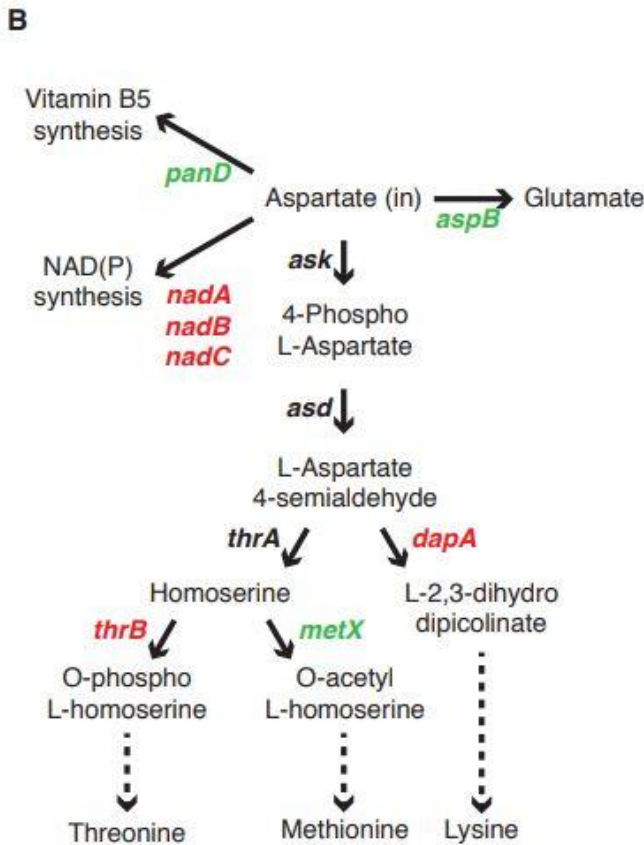


Рисунок 2.2. Шлях катаболізму аспартату у *M. bovis* [55]

2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Як вже було вказано вище, вакцина БЦЖ ліофілізована (жива) складається з атенуйованого вакцинного штаму мікобактерій у розчині стабілізатору. Перед проведенням вакцинації, суху біомасу розчиняють у розчині натрій хлориду для ін’єкцій.

Виробництво вакцини базується на системі посівних серій. У ході виготовлення, повинні бути підтвердження, що методи, які застосовуються, зможуть дати вакцину БЦЖ, яка здатна викликати формування адекватної

чутливості до туберкуліну у людини та володіє прийнятною захисною активністю у тварин [56].

Справжність вакцини встановлюють при проведенні мікроскопіювання мазків із результатом, вже описаним раніше. Відповідність також перевіряють шляхом посіву вакцини на щільне середовище Левенштейна-Йенсена через 28-30 діб інкубації за оптимальної для мікобактерій температури. У результаті, на поверхні середовища спостерігають характерні шорсткуваті щільні колонії 0,5-0,8 мм у діаметрі, жовтуватого (або слонової кістки) кольору з тонкими нерівними краями.

Перевіряють також час відновлення препарату. Це здійснюють шляхом додавання розчинника (розчину хлориду натрію 0,9%) до вмісту ампули. Протягом не більше 1 хв спостерігають утворення грубодисперсної гомогенної суспензії. Допускають утворення пластівців, які повинні розбиватись при перемішуванні шприцом або піпеткою (2-4-кратним, не більше). При цьому показник дисперсності готової вакцини повинен бути не нижче 1,5. Випробовування перевіряють фотометричним методом. Якщо за результатами аналізу не більше, ніж в 1 зразку показник дисперсності нижче 1,5 – проводять додаткові випробовування на 10 зразках. Одночасно з цим здійснюється перевірка на загальний вміст бактерій.

Загальний вміст бактерій перевіряється також фотометричним методом при довжині хвилі $\lambda=(490\pm0,3)$ нм у кюветі з товщиною стінки 5 мм. Контролем у цьому дослідженні слугує розчин хлориду натрію. Показник оптичної густини повинен бути у межах 0,30-0,40, що відповідає 1,0 мг/мл мікробних клітин БЦЖ. Перевіряють не менше 10 зразків паралельно зі стандартним зразком [25].

Вакцина БЦЖ повинна відповідати також нормам мікробіологічної чистоти: не допускається наявність сторонньої мікрофлори – бактерій чи грибів (окрім мікобактерій). Дане випробування відповідно до

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						37
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

фармакопейної статті ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильність» або (статті ДФУ 2.6.1) здійснюють методом прямого посіву [25, 56].

Відповідно до випробування на токсичність – вакцин повинна бути нетоксичною. Випробування здійснюють відповідно ОФС.1.2.4.0004.15 «Аномальна токсичність».

Вакцина БЦЖ – термостабільна. Перевірку відповідності здійснюють випробуванням: зберігають вакцину протягом 4 тижнів при температурі $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, при цьому число життєздатних клітин в 1,0 мг вакцини повинно складати не менше 25% (відповідно до фармакопейної статті ДФУ – не менше 20%) від вихідного числа, яке визначається у зразках, що зберігались при температурі $2-8^{\circ}\text{C}$. Випробування здійснюють над кожною 5 серією препарату.

Проводять випробування на специфічну безпеку. Вакцина БЦЖ не повинна вміщувати вірулентних мікобактерій. Для цього проводять випробування на морських свинках однієї статі масою від 250 до 350 г, які не піддавались попередньо лікуванню або дієті з антибіотиками (що може впливати на результат) – здійснюють введення тест-дози 5 мг вакцини на 1 мл розчиннику [25].

За тваринами спостерігають протягом 42 діб. У кінці періоду спостереження морських свинок умертвляють, проводять розтин та подальше дослідження на ознаки туберкульозної інфекції (виключенням дослідження є мінорні реакції у ділянках інфекції). Тварин, загинув у ході випробування також обстежують на наявність туберкульозу. Вакцина є такою, що витримала випробування, якщо у жодної тварини не було виявлено ознак туберкульозу і в період спостереження усі тварини залишались живими. Якщо у процесі спостереження гинуть 2 морські свинки, але при розтині не виявляють ознак туберкульозної інфекції, – випробування повторюють на інших 6 морських свинках. Вакцина є безпечною, якщо протягом 42 діб після

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		38

введення ін'єкції гине не більше, ніж одна тварина, а розтин не виявляє ознак захворювання [56].

Підвищена шкірна реакція – один з важливих параметрів вакцини БЦЖ. Для перевірки використовують 6 здорових, білих або світлих морських свинок, масою кожна не менше 250 г. Вони повинні бути такі, що не піддавались лікуванню або додаванню антибіотичних речовин до дієти, адже це може впливати на результат випробування. Надалі кожній вводять підшкірно по 0,1 мл розчиненої вакцини, 2 десятикратних послідовних розведення розчиненої вакцини (1:10 та 1:100) та ідентичні дози вакцини порівняння. Спостерігають за зовнішнім виглядом уражень на ділянках ін'єкцій протягом 4 тижнів. Вакцина витримує випробування у тому випадку, якщо реакція помітно не відрізняється від реакції на вакцину порівняння [56].

Проводять також випробування на дослідження специфічної активності – кількість життєздатних клітин БЦЖ у 1 мг вакцини. Застосовують метод посіву вакцини на щільне поживне середовище Левенштейна-Йенсена. Посів проводять паралельно з СО або з референс-препаратом.

У разі проходження усіх випробувань вакцина допускається до використання у вакцинації. Щороку також додатково проводять моніторинг поствакцинальних ускладнень та причин їх появи [25].

2.4. Методи очистки цільового продукту

Вирощена культура вакцинного штаму *M. bovis* BCG-1 піддається попередньому звільненню від культурального середовища – очищенню. Відділення мікробної культури від середовища здійснюють поступово, і головному процесі в очищенні – центрифугуванню – передують ряд інших процесів, зокрема:

- Фільтрація мікробної маси культури BCG-1;
- Промивання середовищем висушування;

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		39

- Розтирання біомаси на шуттель-апараті до отримання однорідної маси;
- Розведення стабілізатором (відповідно до фармакопейної статті – глютаматом натрію для отримання необхідної концентрації);

Далі слідує центрифугування, яке проводять при досягненні концентрації 50 мг БЦЖ у 1 мл, протягом 2000 об/хв протягом 15-20 хв. Після чого проводять додаткове розведення тим же стабілізатором для отримання надосадової зависі з концентрацією 0,5 мг *M. bovis* в 1 мл [5].

Глутамат натрію слугуватиме кріопротектором та забезпечуватиме життєздатність мікобактерій у подальшій ліофілізації. При проходженні усіх операцій необхідно запобігати контакту вакцини зі прямими сонячними чи ультрафіолетовими променями [17, 25, 56].

2.5. Механізм впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Ефективна вакцинація, як така, направлена запобігти формуванню «відкритих» форм туберкульозу, стаючи важливим фактором, що обмежує поширення інфекції [57].

Вакцина БЦЖ направлена на створення імунної відповіді проти туберкульозу, яка покладається на $CD4^+$ Т-клітини та, певною мірою, на клітини $CD8^+$ Т, тому захисні вакцини потребують індукції антигенспецифічних Т-клітин через пептиди, представлені МНС-II та МНС-I в інфікованих макрофагах [35, 36].

Початкова відповідь на введення вакцини відбувається на місці інокуляції (шкіряному покриві), де резидентні макрофаги та дендритні клітини (ДК) взаємодіють із мікобактеріями через різні рецептори, що експресуються на їх поверхні. Макрофаги та ДК фагоцитують бактерії, ініціюючи вроджену імунну відповідь шляхом секреції імуномодуючих компонентів, таких як цитокіни та хемокіни [57].

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		40

Макрофаги власне забезпечують саме процес фагоцитозу, вказану вище секрецію імуномодуляторів, а також презентацію антигенів клітинам адаптивної імунної системи, після загибелі клітин бактерій через механізми внутрішньоклітинного знищення.

Нейтрофіли також потрапляють до місця інокуляції та беруть участь в формуванні імунної відповіді. Вони виділяють велику кількість хемокинів та цитокінів, стимулюючи появу довгоживучих фагоцитів. Взаємодія нейтрофілів з БЦЖ збільшує їх експресію маркерів адгезії, що симулює їх регуляцію цитокінів (IL-1 α , IL-1 β та TGF β) та хемокинів (наприклад, IL-8, CL2 і CL3). Інфіковані БЦЖ нейтрофіли взаємодіють із незрілими дендритними клітинами, посилаючи їм сигнали дозрівання, а також допомагають ДК у представленні антигенів БЦЖ CD⁺4 та CD⁺8 Т-клітин [59].

Завантажені бактеріями дендритні клітини, що експресують їх антигени на своїй поверхні, слугують переносниками від місця інокуляції до дренуючих лімфатичних вузлів.

Власне стимуляція дендритних клітин може значно підвищити поверхневу експресію комплексу гістосумісності класу II. Також вони, будучи інфікованими БЦЖ, забезпечують секрецію TNF, IL-1, IL-6, IL-4 та IL-10, але не IL-12 (баланс між останніми інтерлейкінами дозволяє активувати та прискорити процес дозрівання дендритних клітин). Додаткове індукування проліферації Т-клітин та секреції IFN γ , що ідентифікується T_h1 є критично важливим у контролі клітин мікобактерій після вакцинації [61].

При потраплянні ДК до лімфатичних вузлів відбувається стимуляція CD⁺4 хелперних та CD⁺8 цитотоксичних, а також CD⁺1 обмежених Т-клітин, TNF, Т-регуляторних та В-клітин. CD⁺4 та CD⁺8 Т-клітини мігрують із лімфатичних вузлів до місця інокуляції та забезпечують необхідну стимуляцію вроджених клітин. CD⁺4 клітини забезпечують активацію

макрофагів, а також залежно від стимулів, що присутні у мікрооточенні, диференціюються на:

- T_h1 CD^+4 – ідентифікуються по продукуванню $IFN\gamma$;
- T_h17 CD^+4 – ідентифікуються по продукуванню $IL-17$; здійснюють захист проти виникнення патологій; допомагають у появі відповіді ні $Th1$; синергізм між відповідями $IL-17$ і $IL-10$ та відповіді нейтрофілів, відіграють роль у формування довготривалого імунітету;
- T_h2 CD^+4 – відіграють важливу роль при у новонароджених, підвищуючи ефективність БЦЖ при введенні [61].

У той час CD^+8 Т-клітини опосередковують свої функції, проводячи лізис інфікованих клітин шляхом осмотичного руйнування, а також секретуючи цитокіни. Саме ці клітини є критичним для формування захисту організму від мікобактерій туберкульозу. Інший підряд вказаних вище клітин, таких як Т-регуляторні клітини та CD^+1 -обмежені Т – клітини виникають після вакцинації меншою мірою, але останні, зокрема, забезпечують розпізнавання БЦЖ-інфікованих дендритних клітин [61].

В-клітини диференціюються у плазматичні клітини, які продукують антитіла, або у В-клітини пам'яті, будуючи гуморальну відповідь на вакцинацію БЦЖ. Висока продукція антитіл плазматичними клітинами пов'язана зі прогресивним збільшенням рівнів імуноглобулінів IgM, IgG, а також IgA. Останній особливо усилює фагоцитоз мікроорганізмів при взаємодії з IgG, а також цитотоксичність через ефекторні Т-клітини, блокуючи опсонізацію патогену IgG, потенційно попереджуючи взаємодію з рецепторами Fc γ . Протягом всього процесу клітини пам'яті виникають з тих В-клітин, які реагували на інфекцію і були зосереджені у таких периферійних органах, як легені [62].

Разом клітини адаптивної імунної системи організовують імунну відповідь у спробі встановити імунітет до мікобактерій [61].

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		42

Проблема у неефективності вакцини БЦЖ у формуванні імунітету до туберкульозу може полягати у нездатності вакцини забезпечувати оптимальний баланс CD^{+4} та CD^{+8} Т-клітинних зв'язків імунітету, а також у відсутності вироблення довготривалих центральних Т-клітин пам'яті. Принциповим недоліком вакцини БЦЖ є поступове зниження напруження поствакцинального імунітету (протягом 3-7 років), і вже через 10 років після вакцинації спостерігають повну відсутність захисного ефекту, що призводить до появи потреби у ревакцинації, яка також нести за собою поствакцинальні ускладнення [57].

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
						43
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

Атенуйована вакцина БЦЖ російського субштаму *M. bovis* BCG-1 взагалі вважається однією з перших дочірніх субштамів вперше отриманої А. Кальметом та К. Гереном. ЦДК Наукового центру експертизи продуктів медичного призначення отримав вихідний штам *M. bovis* BCG ще у 1925 році, того ж року була введена і назва BCG-1. З 1940 року субштам зберігається методом ліофілізації. І вже у 1945 році вперше було адаптовано систему посівів. Унаслідок цього, наразі використовують для виробництва вакцини БЦЖ посівну партію 368 «Щ» (2006) [63].

Генотипування *in silico* підтвердило геномну особливість російського субштаму, яка є у всіх «ранніх» субштамах та полягає у делеції розміром 10 кб. Це так звана відсутня ділянка гену RD₁ (яка є характерною для мікобактерій туберкульозу людини). Було відмічено і делецію в 1,6 кб, яка прямо впливає на гомологи Rv3697c та Rv3698, і наявна тільки у російському субштамі, але відсутня в інших [64, 65].

Встановлення профілю споліготипу (метод, що базується на визначенні прямих повторів (DR) на правій та лівій сторонах IS6110) досліджуваного субштаму полягає у відсутності спейсерів 3, 9, 16 і 39-43, що є типовим для *M. bovis* і відповідає даним базі даних SpolDB4 [66].

При проведенні перевірки повторів MIRU-VNTR (мікобактеріальних диспергованих одиниць змінного числа копій – унікальних повторів зі змінним числом копій, відповідно) були отримані дані, надані у таблиці нижче (Табл. 3.1). Виходячи з цього, кількість повторів MIRU_4/ETR_D складає 3, що підтверджується і в додаткових сиквенсах, але при практичному дослідженні субштаму кількість повторів у даному локусі

					ДП 6207. 00.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Левкоївська А.В.					44	150
Перевір.		Орядінська Л.Б.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівн.		Орядінська Л.Б.						
Затверд.								

складало 2. Насамперед така розбіжність теоретичних і практичних даних пояснюють складністю ампліфікації геномів багатих на GC, і більше схиляються до правильності саме теоретичних даних (при секвенуванні ампліконів в умовах, бажаних для таких геномів) [67].

Таблиця 3.1

Комбінація повторів у локусах MIRU-VNTR субштаму *M. bovis* BCG-1

Локус	Комбінація повторів у локусі, bp	Локус	Комбінація повторів у локусі, bp
MIRU_2	(53·2)+8*	MIRU_23	(53·4)+5
Mtub04	(51·0)+30	MIRU_24	(54·2)+30
ETR_C	(58·4)+37	MIRU_26	(51·5)+13
MIRU_4/ETR_D	(77·3)+4	MIRU_27/QUB-5	(53·3)+25
MIRU_40	(54·2)+19	Mtub34	(54·2)+51
MIRU_10	(53·1)+51	MIRU_31/ETR_E	(53·2)+3
MIRU_16	(53·3)+18	Mtub39	(58·2)
Mtub21	(57·0)+34	QUB-26	(111·4)+24
MIRU_20	(77·2)+11	QUB-4156	(32+(59·0)+19)
QUB-11b	(69·3)+10	MIRU_39	(53·1)+29
ETR_A	(75·5)+20	QUB-3232	(56·5)+48
Mtub29	(13+(57·1)+35)	VNTR3820	(59·5)+47
Mtub30	(58·1)+53	VNTR-4120	(57·2)+23
ETR_B	(57·5)+8		

* (Розмір одиниці повтору (п.н.)·Число повторів)+Частковий розмір повтору (п.н.)

Саме тому профіль мікобактеріальних вкраплених повторюваних одиниць (MIRU) досліджуваного субштаму на основі 12 локусів складає 232, 324, 253, 222 відповідно до аналізу геному [65].

Перевірка повторів, взагалі, побудована на основі методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і слугує більше для класифікації та ідентифікації субштамів [68].

Порівнюючи геноми BCG Russia та BCG Tokyo (геном останнього використовується при порівняльному аналізі як контрольна послідовність), було виявлено незначні відмінності в інсерціях та делеціях розмірами не більше 9 нуклеотидних пар. Кількість одонуклеотидних поліморфізмів (SNP) була майже однакова у двох пар геномів. Несинонімічні SNP у БЦЖ російського субштаму складають 60%, але більшість з них пов'язана із консервативними замінами у білках: тільки сім білків мали радикальні заміни, хоча три з них були із сімейства PE-PGRS/ PEE, що відіграють свою роль в адаптації субштаму БЦЖ [65].

Не менш важливою є роль RD у диференціюванні субштамів БЦЖ. Саме тому були побудовані рестрикційні карти, які показали, що геноми російського субштаму та контрольного японського мають схожість у районі DU₂, що забезпечує приналежність обох субштамів до однієї групи (DU₂-I, через наявність тандемної дуплікації послідовності розміром ≈20 кб у позиції 3 684 229-3 704 932) (Рис. 3.1, Рис.3.2) [65, 69].

Після встановлення кількості повторів DU₂ було візуалізовано всю геномну безщілинну хромосому BCG Russia 368, що представлена у додатку Б.

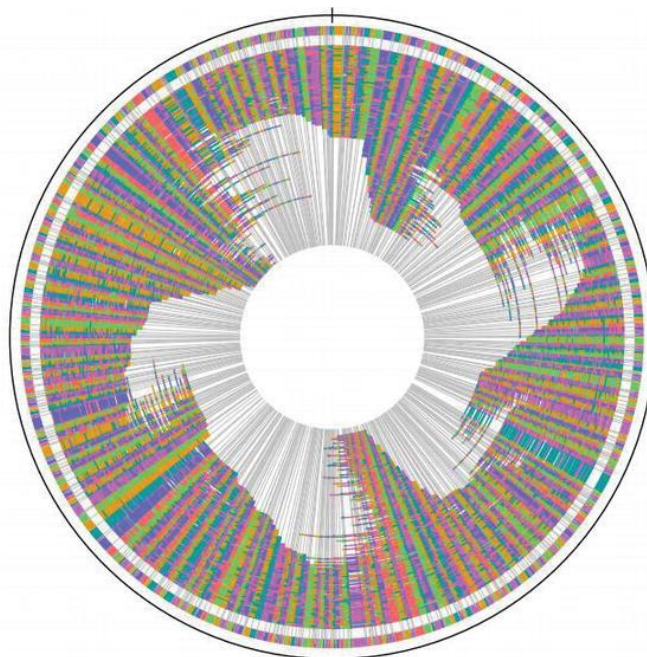


Рисунок 3.1. Кругова рестрикційна карта BCG Russia 368 всього геному. Карта рестрикції отримана шляхом розщеплення ДНК за допомогою NheI [65].

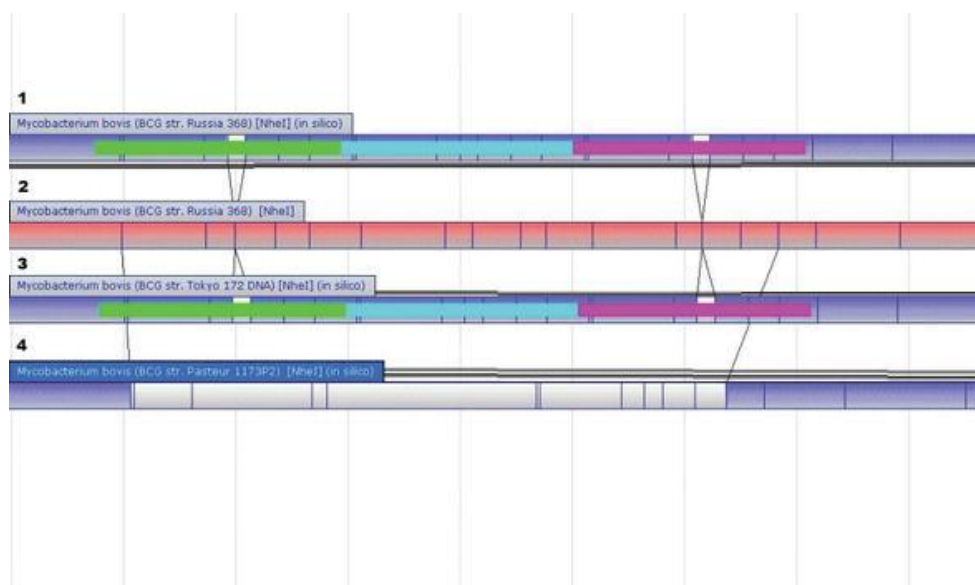


Рисунок 3.2. Вирівняні карти для BCG Russia 368 та контрольних субштамів, створені для ділянки DU₂. Деревоподібні копії ділянки DU₂ у геномах BCG Russia 368 та BCG Tokyo 172 відмічені зеленим, синім та фіолетовим. Область DU₂ (від генів astB до sdhD) представлений зеленим кольором [65].

Різні типи повторів, які візуалізовані на геномній карті корелюють з конкретними елементами геному, що ідентифіковані з конкретними ресурсами (Табл. 3.2) [65].

Таблиця 3.2

Специфічні елементи геному у геномі BCG Russia.

Назва	Число
REP (екстрагенний паліндромний елемент, що повторюється)	6
CRISPR (короткі паліндромні повтори ДНК, розміщені групами)	5
Профаг	2
Ген білку PPE	66
Ген білку PE	33
Ген білку PE_PGRS	69
IS елементи	41

Розміщення елементів інсерційних (IS) фрагментів, повторів, послідовностей профагів і генів PE, PPE, PE_PGRS у геномі винесені окремо (Рис. 3.3). Більшість елементів, що повторюються у геномі субштаму, включаючи деякі послідовності профагу, збігаються, перекриваються або взаємопов'язані. Саме тому деякі фрагменти геному BCG Russia 368 важко аннотувати [65].

Наявність послідовностей профагів характеризує мозаїчну структуру геному мікобактерій вакцини БЦЖ. У російському субштамі було виявлено найбільшу кількість схожих профагів до характерних для *M. bovis*, зокрема: профаги у 7,5 кб (із повторами у 922 п.н., розміщені біля інсерційного фрагменту ISM₁₁) , профаг 11,2 кб (який відповідає профагу 20,3 кб мікобактерій бичачого туберкульозу), профаг 11 кб (пов'язаний з інсерційним фрагментом IS6110), а також розділені на 5 та 3 частини

відповідно профаги 13,4 та 13,9 кб (які є більш характерні для BCG Tice). Наявність профагів, а також їх зв'язок з інсерційними елементами суттєво впливають на еволюцію геному [65].

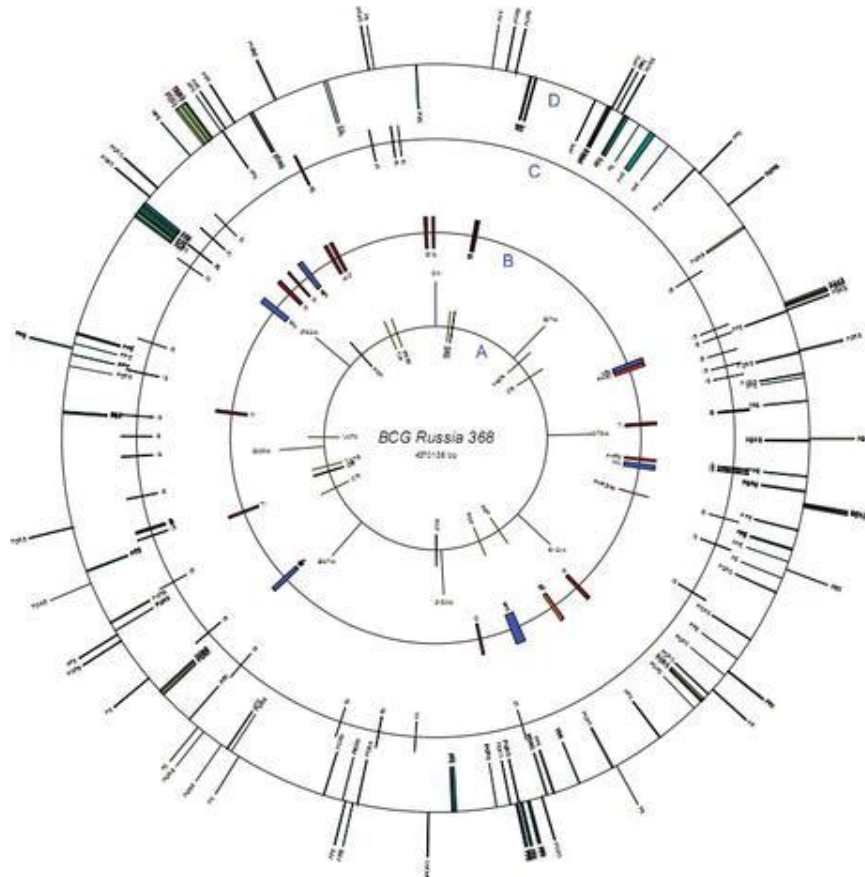


Рисунок 3.3. Локалізація мобільних елементів (повторів(REP, VNTR, CRISP: коло A), профагових послідовностей (коло B), IS-елементів (коло C)), генів PE, PPE, PE_PGRS (коло D) у геномі BCG Russia [65]

У загальному, останнє дослідження геному показало: довжина однієї кільцевої хромосоми російського субштаму складає 4 363 945 п.н. при середньому вмісті G+C 65,5%. 4119 генів були точно передбачені і включали 3 рРНК (16, 5 і 23 субодиниці, організовані як типові цистрони рДНК), 45 тРНК, 34 рухомі елементи та 159 тандемних і паліндромних повторів, 2 копії IS6110 [63, 70]

Процес генетичного дослідження кожної посівної партії вакцинного субштаму є вкрай важливим, адже є необхідність здійснювати контроль генетичної стабільності, яка є запорукою якості готової вакцини.

Було доведено, що вакцинні субштами, отримані різними виробниками вакцин з одного джерела клітин, з часом набувають мутацій. Вимога щодо важливості молекулярно-генетичної характеристики була висловлена і ВООЗ [65].

Так, порівняльний аналіз трьох посівних партій вакцинного штаму *M. bovis* BCG-1 різних років – BCG Russia 311 (1963), BCG Russia 977 (1982), BCG Russia 368 (2006) – показав тільки дві відмінності в останній посівній партії. Перша відмінність полягала у наявності однонуклеотидному поліморфізмі (SNP) у положенні 3175301, що призводить до синонімічної мутації у гені уридилтрансферази (при цьому, посівних партіях попередніх років цієї мутації не було виявлено).

Наступна зміна лежить у гені гліцерол-3-фосфатацилтрансферази, яка полягає у вставці послідовності основ TGT замість основи C у положенні 2 744 580 і робить білок вкороченим (Рис. 3.4). Проте дана мутація не стосувалась консервативного домену гліцерол-3-фосфатацилтрансферази, саме тому фермент залишається функціональним. До того ж, дана мутація була зареєстрована лише на посівних партіях 1963 та 1982 років, в останньому поколінні BCG Russia 368 виявлено не було [65].

Саме тому геном вважають структурованим, усі посівні партії зберігають свою стабільність.

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
						50
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

```

368      VTKPAADASAVLTAEDTLVLASTATPVEMELIMGWLGGQQRARHPDSKFDILKLPPRNAPP
977      VTKPAADASAVLTAEDTLVLASTATPVEMELIMGWLGGQQRARHPDSKFDILKLPPRNAPP
*****

368      AALTALVEQLEPGFASSPQSGEDRSIVPVRVIWLPPADRSRAGKVAALLPGRDPYHPSQR
977      AALTALVEQLEPGFASSPQSGEDRSIVPVRVIWLPPADRSRAGKVAALLPGRDPYHPSQR
*****

368      QQRRIILRTDPRRARVVAGESAKVSELRQQWRDITVAEHKRDFQFVSRRALLALARA EYR
977      QQRRIILRTDPRRARVVAGESAKVSELRQQWRDITVAEHKRDFQFVSRRALLALARA EYR
*****

368      ILGPQYKSPRLVKPEMLASARFRAGLDRI PGATVEDAGKMLDELSTGWSQVSDLVSVLG
977      ILGPQYKSPRLVKPEMLASARFRAGLDRI PGATVEDAGKMLDELSTGWSQVSDLVSVLG
*****

368      RLASRGFDPEFDYDEYQVAAMRAALEAHPAVLLFS# # #GVVVPVAMQDNRLPPVHMF
977      RLASRGFDPEFDYDEYQVAAMRAALEAHPAVLLFS# # #GVVVPVAMQDNRLPPVHMF
*****
      #####
368      GGINLSFGLMGPLMRRSGMIFIRRNIGNDPLYKYVLKEYVGVVVEKRFNLSWSIEGTRSR
977      GGINLSFGLMGPLMRRSGMIFIRRNIGNDPLYKYVLKEYVGVVVEKRFNLSWSIEGTRSR
*****

368      TGKMLPPKLG LMSYVADAYLDGRSDDILLQGVSICFDQLHEITEYAAYARGAEKTP EGLR
977      TGKMLPPKLG LMSYVADAYLDGRSDDILLQGVSICFDQLHEITEYAAYARGAEKTP EGLR
*****

368      WLYNFIKAQGERNFGKIYVRFPEAVSMRQYLGAPHGELTQDPAAKRLALQKMSFEV AWRI
977      WLYNFIKAHRGNATSARSTFASPKRSRCASTSAHRTAS*-----
*****
      ^
368      cccctg-c-gccttgatgaagttgtagagccagcgcaaaccttcgggcgtcttctccgcg
977      cccctgtgtgccttgatgaagttgtagagccagcgcaaaccttcgggcgtcttctccgcg

```

Рисунок 3.4. Порівняння варіантів гліцерол-3-фосфатацилтрансферази у трьох поколіннях російської вакцини БЦЖ (А). Фрагмент гліцерол-3-фосфатацилтрансферази з мутацією (В) [65].

Раніше цю стабільність у геномі *M. bovis* BCG-1 пов'язували з інактивацією гену *recA* (що відповідає за отримання RecA – багатофункціонального і досить поширеного рекомбіназного білку, що бере участь як у загальній рекомбінації, так і в репарації ДНК; саме RecA-залежна рекомбінація призводить до генетичної перебудови, що є причиною генетичної нестабільності, хоча і контрольовані ним механізми репарації важливі для внутрішньоклітинної виживаності та персистенції) через наявність одонуклеотидної вставки «С» на кінці, що призводить до появи стоп-кодону і відсутності синтезу рекомбінази А (Рис. 3.5) [71].

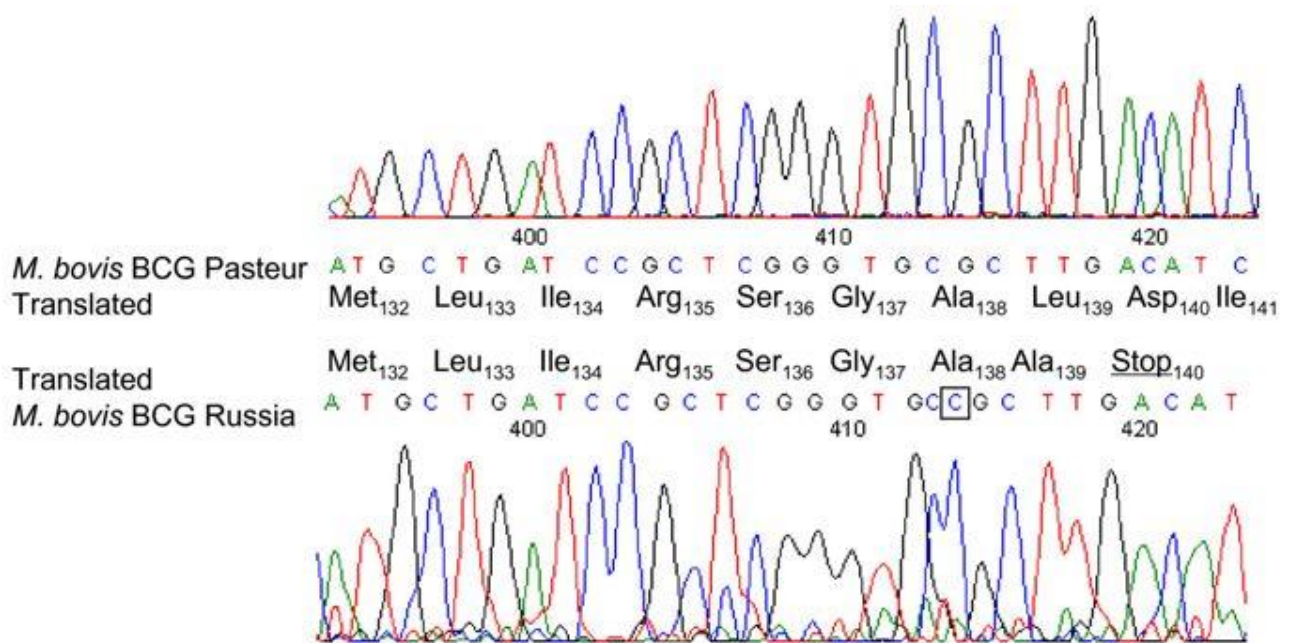


Рисунок 3.5. Порівняльне вирівнювання електрофореграм секвенування ДНК для *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 та BCG Russia, що демонстрував інсерційний SNP (C₄₁₄) у гені *recA*. Як наслідок, Leu₁₄₉ замінювався на Ala, за яким слідував стоп-кодон [71].

Проте останні отримані послідовності усього геному спростовують це. Таким чином, вся рамка зчитування для рекомбінази A є аннотованою – вихідний субштам BCG-1 не є мутантом *recA*, і стабільність геному не залежить від цього [65].

3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

В основі отримання живої вакцини БЦЖ лежить процес атенуації – зниження вірулентності збудника інфекційного захворювання, у даному випадку бактерій *M. bovis*. При цьому, виходячи з інформації про імуногенність та антигени штаму BCG-1, мікроорганізми повинні не мати здатності викликати захворювання (у даному випадку туберкульоз), але

зберігати здатність розмноження в організмі людини, якій ввели вакцину, і створення активного імунітету.

Процес атенуації можливо здійснити наступним шляхом:

- Штучно отримати атенуйованих збудників шляхом довготривалого культивування на поживних середовищах в умовах не оптимального росту; шляхом безпосереднього впливу мутагену на генетичний матеріал мікроорганізму;
- Штучне отримання генетичних рекомбінантів, що зберегли свою імуногенність (при зниженні вірулентності);
- Селекцією мутантів з ослабленою вірулентністю, які виникли спонтанно, але зберегли специфічні протективні антигени та імуногенність [17].

3.2.1. Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів

Найперший штам вакцини БЦЖ, від якого розійшлися усі дочірні субштами, зокрема і *M. bovis* BCG-1, був отриманий шляхом пасажування (було здійснено 230 пасажів) протягом 13 років. Процес проходив висіванням мікобактерій бичачого туберкульозу, отриманих з молока корови, хворої на мастит, на картопляному середовищі з додавання гліцерину та бичачої жовчі. Дане підібране середовище вважалось несприятливим для росту мікобактерій [3].

Після перших 30 пасажів, було здійснено перевірку: бактерії ввели до організму морських свинок. У результаті, отриманий штам не викликав інфекції в їх організмі. Після 60 пасажів штам ще був вірулентним для коней та кроликів, але авірулентним для морських свинок, мавп та телят. Проведений експеримент у 1912 році показав, що телята, яким тоді були

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
						53
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ведені мікроорганізми зберігали свою стійкість до подальшого зараження вірулентними мікобактеріями [3].

Пасажування протягом наступних років давало ясне розуміння про зміну і морфології бактерій, і показника вірулентності (зниження останнього було регулярним). Воно продовжувалось до моменту, поки атенуація штаму не вважалась задовільною. Зниження показника вірулентності точно пов'язують із делецією ділянки RD₁ у геномі мікобактерій, а також накопиченням SNP (її роль вже була описана у розділі 1, пункті 1.5). І навіть після проведення пасажування понад 200 разів, реверсії вірулентності не спостерігали [72, 73].

До сьогодні залишається невідомо, що стало причиною атенуації: вплив бичачої жовчі, як несприятливого фактору середовища, чи поява мутації, що призвела до ослаблення вірулентності, була наслідком довготривалого пасажування мікобактерій [3].

Розходження між субштамами на генетичному рівні списують на використання різних, хоча й однакових, компонентів середовища, зокрема тієї ж картоплі, при вирощуванні у лабораторіях *in vitro* [74].

Варто вказати й на те, що після введення системи посівів, а також ліофілізації субштамів БЦЖ, уся еволюція мікобактерій *in vitro*, процес подальшої атенуації були зупинені. Це доводить і стабільність геному російського субштаму, що описується вище [72].

3.2.2. Використання методів генної інженерії

Унаслідок розуміння імунологічних недоліків вакцини БЦЖ, отриманої у результаті пасажування, геному мікобактерій, дають поштовх у розробці нових перспективних препаратів протитуберкульозних вакцин із використанням генетичних методів [75].

Зокрема, нині на меті стоїть отримання:

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
						54
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- Цільноклітинних вакцин БЦЖ. У основі їх створення лежать методи генетичного конструювання рекомбінантних вакцин із додатковими протективними властивостями, шляхом введення білків та генів, що будуть забезпечувати синтез білків, з використанням човникових векторів (при використанні *M. bovis* BCG-1), а також інших сапрофітних та/або непатогенних мікобактерій (*M. vaccae*, *M. indicus pranii*) [76].

- ДНК-вакцин. Задача створення базується на отриманні генів протективних білків у складі плазмідного вектора або геному рекомбінантного вірусу, що експресує гени білків в організмі, що піддають імунізації. Такі вакцини матимуть набагато нижчу імуногенність, і потребуватимуть особливих умов зберігання.

- Субодиничних вакцин. Створення полягає у використанні отриманих генно-інженерним способом очищених імуногенних білків. Такі препарати найбільш перспективні, оскільки не матимуть у своєму складі зайвих білків та нуклеїнових кислот (які можуть бути причиною додаткової стимуляції імунітету), а лише міститимуть антигени з відомими біологічними властивостями [75].

Отримання вакцини БЦЖ із використанням атенуйованого штаму *M. tuberculosis* також є перспективою у майбутньому. Насамперед, це обумовлено тим, що штами цього виду наділені властивістю індукувати більш стійку захисну імунну відповідь, у порівнянні із вказаними вище перспективними вакцинами. До того ж, цей вид мікобактерій є природним збудником туберкульозу людини, а отже зможе більш точно імітувати природну інфекцію, не викликаючи захворювання. В основі атенуації штаму мікобактерій туберкульозу лежать методи генної інженерії, а саме механізми інактивації генів, зокрема через створення подвійних делецій у геномі [77].

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується у роботі

У роботі, як було вказано у попередніх розділах, використовується російський атенуйований вакцинний субштам *M. bovis* BCG-1, що був отриманий у 1924 році та є одним із перших дочірніх субштамів. Як зазначалось вже вище, ослаблення вірулентних властивостей було здійснено у ході пасажування вихідної культури, подальші пересіви у лабораторіях на території Росії дали додаткові незначні зміни [64].

Загальну схему отримання атенуйованого штаму мікобактерій БЦЖ можна представити наступним чином (Рис. 3.6).

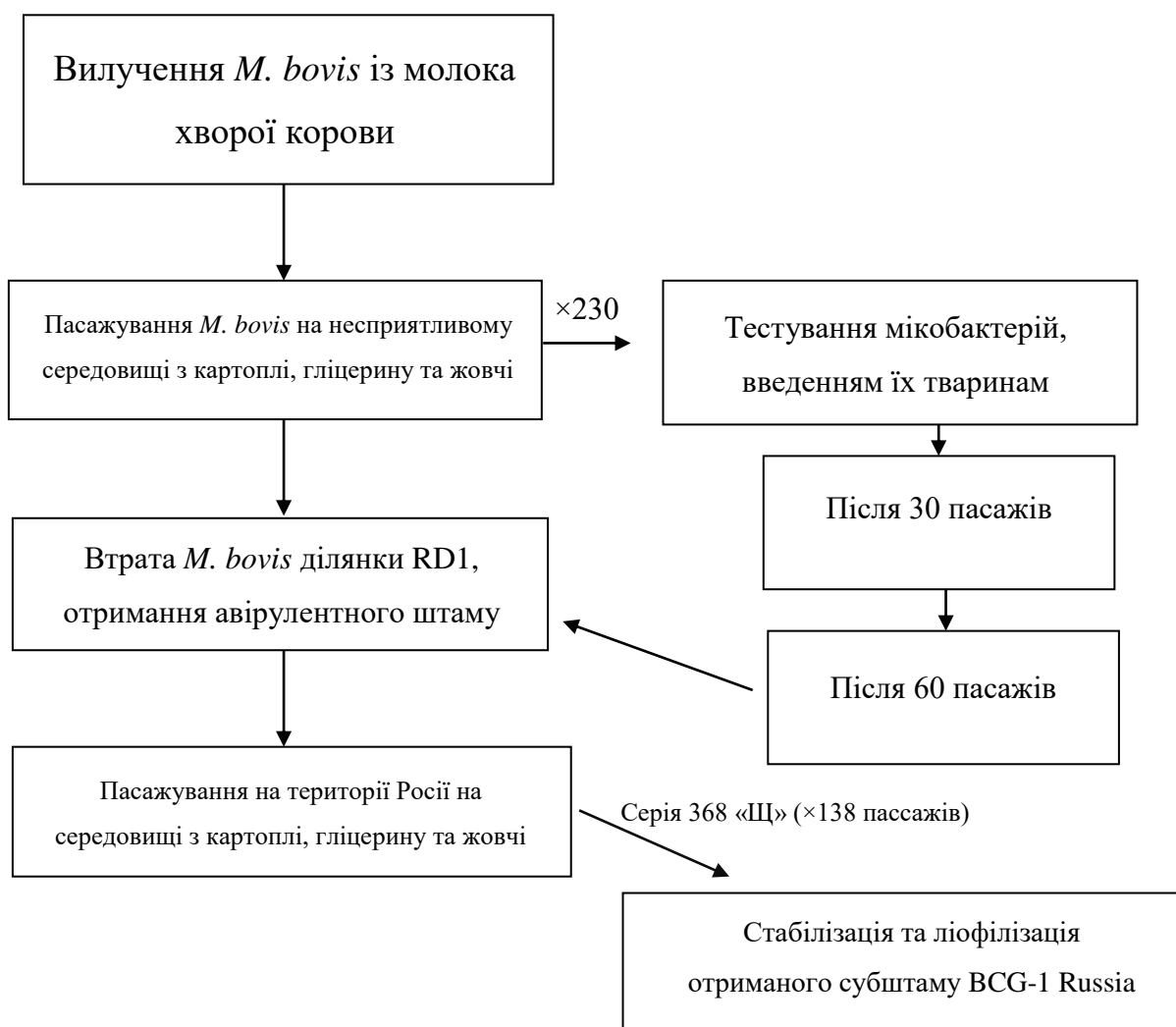


Рисунок 3.6. Схема отримання авірулентного штаму *M. bovis*

3.4. Особливості технології або апаратурного оформлення у зв'язку з використанням обраного продуценту

Особливою вимогою у виробництві вакцини БЦЖ залишається запобігання контакту прямих сонячних чи ультрафіолетових променів з культурою мікобактерій. Насамперед, це пов'язано з тим, що ультрафіолет є мутагенним чинником, що може негативно вплинути на ефективність вакцини БЦЖ у подальшому застосуванні у вакцинації [78].

А також забезпечення додавання до біомаси мікобактерій кріопротектору перед ліофілізацією за для запобігання механічного пошкодження мембран клітин кристалами льоду. Можливе використання вже вказаного раніше глютамату натрію, для якого характерна температура замерзання у -58°C [17, 25].

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
						57
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

Кінцевий продукт представлений ліофілізованою біомасою атенуйованого субштаму мікобактерій, а саме *M. bovis* BCG-1, у середовищі 1,5% стабілізатору глутамату натрію моногідрату в ампулах. У комплекті йде розчинник – 0,9% розчин хлориду натрію для ін'єкцій [25].

Продукт призначений для специфічної профілактики туберкульозу шляхом розвитку імунної відповіді на вакцинацію туберкульозною вакциною [25].

Препарат представлений пористою порошкоподібною масою білого або світло-жовтого кольору, що легко відділяється від днища ампули. Маса є гігроскопічною. Мікробіологічно допускається наявність лише мікобактерій субштаму, не є припустимою бактеріальна чи грибова контамінації (ОФС.1.2.4.0003.15/ ДФУ 2.6.1) [25, 56].

Додаткові характеристики продукції наведені у таблиці (Табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Характеристики кінцевої продукції вакцини БЦЖ

Показник	Норма показнику	Нормативний документ
Аномальна токсичність	Вакцина не токсична	ОФС.1.2.4.0004.15
Втрата маси при висушуванні або Вода	Не більше 5,0%	ОФС.1.2.3.0002.15 ОФС.1.2.1.0010.15

					ДП 6207. 00.000 ПЗ			
					РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Левкобська А.В.						
Перевір.		Орядінська Л.Б.						
Керівн.		Орядінська Л.Б.						
Затверд.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ			
					Літ. Арк. Аркушів			
					58 150			

Термостабільність	Зберігати життєздатність мікробних клітин (не менше 25%) при температурі $37\pm 1^{\circ}\text{C}$	ФС.3.3.1.0018.15
Час відновлення препарату	Не більше 1 хв після додавання до ампули розчинника	ФС.3.3.1.0018.15
Прозорість і кольоровість розчину	Грубодисперсна суспензія білого із сіруватим або жовтуватим відтінком, без сторонніх включень	ФС.3.3.1.0018.15
Дисперсність	Показник дисперсності не нижче 1,5	ФС.3.3.1.0018.15
Герметичність	Ампули повинні бути герметичні	ФС.3.3.1.0018.15

Протитуберкульозна вакцина належить до імунобіологічних лікарських препаратів. Відповідно до цього первинна тара, що забезпечуватиме збереження властивостей препарату, буде представлена ампулою, запаяною під вакуумом, із темного скла, для запобігання потрапляння прямих сонячних чи ультрафіолетових променів [25].

На ампулу нанесена етикетка з обов'язковим позначенням мінімальної та максимальної кількості життєздатних одиниць, що приходить на одиницю розчиненої вакцини, а також кількість доз в одній вакцині – 0,025 мг/доза, 20 доз в ампулі. Також серія, дата виготовлення та кінцевий термін придатності [79].

Комплект представлений з 1 ампули вакцини та 1 ампули розчинника. Відповідно їх поміщають до чарункових контурних упаковок (у кількості – 2 штуки). По 5 ампул із вакциною та розчинником до кожної. Чарункові контурні упаковки з ампулами поміщають у картонну упаковку (ГОСТ 12303). До кожної пачки вкладають скарифікатор для ампул по ТУ-9432-001-07610517-97, а також інструкцію медичного призначення з інформацією про:

лікарську форму, склад, опис лікарської форми, фармакологічну групу, фармакодинаміку, фармакокінетику, показання, протипоказання, застосування під час вагітності та грудному вигодовуванні, спосіб застосування та дози, побічні ефекти, передозування, взаємодію з іншими лікарськими засобами, запобіжні заходи, форму випуску, умови зберігання, термін придатності та умови відпуску [79].

На картонній упаковці обов'язково вказують:

- країну-виробник («Україна»);
- найменування, товарний знак, адресу виробника;
- назву препарату – українською мовою та на латині;
- короткий опис застосування («Ліофілізат для приготування розчину для внутрішньошкірного введення»);
- перелік ампул (основного та додаткового компонента) із зазначенням дозування та/або концентрації та їх кількості;
- умови зберігання;
- умови відпуску («Для лікувально-профілактичних закладів»);
- реєстраційний номер, серійний номер, термін придатності;
- попереджувальні написи («Зберігати у недоступному для дітей місці»);
- штрих-код [79].

Готові картонні упаковки вкладають до картонних коробок на столі для пакування по 100 штук відповідно до ГОСТ 12301.

Транспортне маркування на картонних коробках повинне містити маніпулятивні знаки (зображення, що вказують на способи поводження з вантажем) відповідно до ГОСТ 14192. Зокрема даний препарат потребує запобігання потрапляння вологи, прямих сонячних променів. До кожної одиниці транспортної тари поміщають пакувальний листок відповідно до

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		60

ГОСТ 17768-90 з вказаною інформацією про: назву підприємства; найменування лікарського препарату; номер серії; кількість одиниць упаковок у коробці; прізвище та ім'я пакувальника. Транспортування можливе усіма видами транспорту з дотриманням умов холодового ланцюга.

Відповідно до фармакопейних статей ОФС.1.8.1.0002.15 та ФС.3.3.1.0018.15 зберігання проводиться при температурі від 2 до 8°C у захищеному від світла місці. Термін придатності вакцини та розчинника – 2 роки з дати виготовлення. Препарат після розчинення не підлягає зберіганню [79].

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Дані щодо характеристики усіх використовуваних матеріалів, сировини та напівпродуктів наведені у таблиці нижче (Табл. 4.2)

Таблиця 4.2

Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина			
1.1. Вода очищена	ФС.2.2.0020.15	Відповідно до даних Фармакопейної статті	Для приготування поживного середовища (ПС)
1.2. Картопляне середовище Павловського	ГОСТ Р ЕН 12322-2010 ГОСТ Р 51088-2013	Відповідно до нормативно-технічних документів (НТД)	Поживне середовище для отримання інокуляту(ПС _i)

Продовження таблиці 4.2

1.2.1. Гліцерин	ГОСТ 6259-75	Відповідно до НТД	Компонент ПС _i
1.2.2. Картопля	ГОСТ 28372-93	Відповідно до НТД	Компонент ПС _i
1.3. Модифіковане середовище Сотона	ГОСТ Р ЕН 12322-2010 ГОСТ Р 51088-2013	Відповідно до нормативно-технічних документів (НТД)	Поживне середовище для отриманні інокуляту та культивування (ПС)
1.3.1. Глікокол	ГОСТ 5860-75	Масова частка кислоти амінооцтової не менше 99,8%	Компонент ПС
1.3.2. Амоній лимоннокислий	ГОСТ 9264-79	Відповідно до НТД	Компонент ПС
1.3.3. Калій фосфорнокислий двозаміщений 3-водний (K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O)	ГОСТ 2493-75	Масова частка 3-водного двозаміщеного фосфорнокислого калію не менше 99%	Компонент ПС
1.3.4. Залізо лимоннокисле аміачне (Fe(NH ₄) ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) ₂)	ISO-11290-1	Відповідно до НТД	Компонент ПС
1.3.5. Сірчаноокислий магній 7-водний (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	ГОСТ 4523-77	Масова частка 7-водного сірчаноокислого магнію не менше 99,5%	Компонент ПС
1.3.6. Гліцерин	ГОСТ 6824-96	Відповідно до НТД	Компонент ПС

2. Допоміжна сировина			
2.1. Вода водопровідна	ДСТУ 7525:2014	Органолептичні, та хімічні показники відповідно до НТД та вміст мікроорганізмів та бактерій відповідно до ДСанПіН	Мийка обладнання та приміщень, перевірка герметичності ампул
2.2. Вода демінералізована	ФС 24-2619-99	Відповідно до даних Фармакопейної статті	Мийка обладнання, зовнішня мийка первинної упаковки
2.3. Вода для ін'єкцій	ФС.2.2.0019.15	Відповідно до даних Фармакопейної статті	Внутрішня мийка первинної упаковки
2.4. Натрію глутамат моногідрат	1446600 USP	Відповідно до даних Фармакопейної статті	Кріопротектор
2.5. Натрію хлорид 0,9% розчин	Реєстраційне посвідчення № UA/13557/01/01 від 30.11.2018	Органолептичні показники, теоретична осмолярність 308 мосмоль/л, рН 5,0-7,0	Розчинник для приготування ін'єкції
2.6. Азот газоподібний	ГОСТ 9293-74	Відповідно до НТД	Для наповнення та запаювання ампул
2.7. Метиленовий синій	ДСТУ Б EN 933-9:2015	Відповідно до НТД	Для перевірки герметичності ампул
2.8. Аміачний розчин	ГОСТ 4517-75	Відповідно до НТД	Для регулювання рН середовища
2.9. Соляна кислота (HCl)	ДСТУ 2904-94	Відповідно до НТД	Для регулювання рН середовища

Продовження таблиці 4.2

2.10. Спирт етиловий ректифікований (C ₂ H ₅ OH)	ДСТУ 4221:2003	Масова частка спирту (70%)	У якості дезінфекційного розчину
2.11. Перекис водню (H ₂ O ₂)	ГОСТ 177-88	Масова частка перекису водню (2-6%)	У якості дезінфекційного розчину
2.12. Засоби миючі синтетичні	ДСТУ 2207.3-93	Відповідно до НТД	Для санітарної підготовки виробництва
2.13. Фамідез Комбі	Реєстраційний номер №05.03.02-08/1035 від 27.11.2014 р.		Для санітарної підготовки виробництва
3. Матеріали			
3.1. Ампули з темного скла типу ВО	ТУ 9462-001-53908805-2006	Розміри та зовнішній вигляд	Первинна тара для ліофілізованої біомаси
3.2. Ампули скляні типу ВО	ГОСТ 18122-75	Розміри та зовнішній вигляд	Первинна тара для розчинника
3.3. Чарункові контурні упаковки	ОСТ 64-071-89 ГОСТ 17768-90	Розміри, зовнішній вигляд	Для розміщення ампул, по 5 шт. у одній упаковці
3.4. Скарифікатори	ТУ-9432-001-07610517-97	Розміри, матеріал	Для відкриття ампули шляхом надрізу
3.5. Картонні упаковки	ОСТ 64-071-89	Розміри, зовнішній вигляд	Вторинна упаковка
3.6. Картонні коробки	ОСТ 64-071-89	Розміри, зовнішній вигляд	По 100 картонних упаковок у одній коробці
3.7. Стрічка з липким шаром	ГОСТ 20477-86	Розміри, матеріал, ефективність липкого шару	
3.8. Самоклеючі етикетки	ТУ 9570-001-13866117-2009	Розмір листа, рулону	Створення етикеток для ампул

Продовження таблиці 4.2

3.9. Друкарська фарба	ГОСТ 9980.4-2002	Матеріал, колір, швидкість висихання	Нанесення інформації на етикетку, інструкцію медичного призначення
3.10. Папір крейдований	ГОСТ 21444-2016	Товщина паперу, розміри	Виготовлення інструкції медичного призначення
3.11. Засоби індивідуального захисту	ДСТУ 7239:2011 ДСП 9.9.5.035-99	Відповідно до НТД	Для роботи із умовно патогенними мікроорганізмами
4. Напівфабрикати			
4.1. Посівний матеріал	Відповідно до регламенту, встановленого підприємством	Мікробіологічна чистота, авірулентність	Для засіву виробничих колб та пробірок

4.3. Опис технологічного процесу

Виробництво протитуберкульозної вакцини БЦЖ-М, фасованої в ампули шприцевого наповнення на 5 мл, по 0,5 мг ліофілізованої біомаси мікобактерій, базується на технологічному процесі, що складається з описаних нижче стадій та операцій.

ДР1 Санітарна підготовка виробництва.

Метою санітарною підготовки виробництва є проведення операцій, що будуть націлені на забезпечення: безпеки для роботи персоналу; отримання якісного кінцевого продукту на всіх стадіях; асептичності виробництва.

Сюди відносять етапи підготовки персоналу та одягу для них, допоміжних розчинів для подальшої підготовки виробничих приміщень, обладнання та комунікацій.

Санітарну підготовку виробництва проводять відповідно до нормативних документів, зокрема СТ-Н МОЗ України 42-4.0:2015

«Настанова. Лікарські засоби. Належна виробнича практика» (що побудована на вимогах GMP), а також ДСП 9.9.5.-080-02 «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю» (що розповсюджується на усі організації, що працюють із біологічними агентами I-IV груп патогенності) [80].

ДР1.1 Підготовка персоналу.

ДР1.1.1 Навчання персоналу.

Субштам мікобактерій, що використовується у виробництві вакцини БЦЖ, є атенуйованим, але небезпечним, саме тому для працівників необхідне забезпечення умов праці відповідно до 2 рівня біологічної безпеки (BSL-2) – вони відносяться до збудників III-IV груп патогенності [82].

Підготовка персоналу на даному етапі полягає у навчанні персоналу необхідним навичкам для роботи із патогенними мікроорганізмами. Керування процесу навчання та перевірка отриманих знань здійснюється керівниками цехів та лабораторних приміщень – працівники, що не складають тестування не мають права перебувати у виробничій зоні. Усі працівники мають обов’язково пройти інструктаж із техніки безпеки.

Не менш важливим є навчання працівників до роботи у чистих приміщеннях, що потребують високого рівня асептики. Щодо цього також проводять періодичну перевірку знань. Не обізнаність працівників може привести до зниження якості готової продукції на виробничих етапах.

ДР1.1.2 Санітарна підготовка персоналу

Санітарна підготовка персоналу до роботи здійснюється із застосуванням Наказу МОЗ України від 14 грудня 2001 р. №502 «Методичних рекомендацій для підготовки до роботи та правил поведінки персоналу».

Даний етап має на меті захист як і персоналу від зараження під час роботи, так і власне продукцію від контамінації персоналом.

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

До виробництва вакцинного препарату на основі мікобактерій БЦЖ допускаються тільки ті особи, що є клінічно здоровими, та не пов'язані із роботою над іншими інфекційними агентами. Для цього проводять контроль стану здоров'я на етапі прийняття на роботу – мають бути відсутні хронічні захворювання (персонал повинен бути вільним від ризику туберкульозного інфікування). Перевірка дотримання особистої гігієни лежить в основі контролю санітарно-гігієнічного стану персоналу: мікробіологічного контролю рук, шкіряного покриття, одягу.

У зв'язку із ризиком інфікування, персонал має проходити плановий огляд на відсутність туберкульозу [25].

Для підтримки санітарно-гігієнічного стану, працівники мають дотримуватись правил поведінки в приміщеннях певного класу чистоти. Щоб забезпечити дотримання цих правил, у зонах переодягання та у самих приміщеннях є рекомендованим до встановлення письмових інструкцій [80].

Усі відпрацьовані засоби індивідуального захисту, що були використані працівниками, відправляються на знешкодження.

ДР1.2 Приготування мийних та дезінфекційних розчинів

Призначення мийних та дезінфекційних розчинів – звільнення оброблених ними поверхонь від можливих контамінантів. Обробці підлягають як обладнання та поверхні приміщень, так і власне персонал, відповідно до вимог GMP.

Розчини, що готують на даному етапі відповідно до Наказу МОЗ України від 14 грудня 2001 р. №502 «Методичні рекомендації щодо приготування і застосування робочих розчинів мийних, дезінфекційних, мийно-дезінфекційних засобів та антисептиків», застосовуються у наступних стадіях санітарної підготовки виробництва.

Приготування проводиться працівниками, закріпленими за даним процесом, з обов'язковим дотриманням правил особистої безпеки, та з

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						67
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

використанням засобів індивідуального захисту, зокрема респіратор, гумових рукавичок, панорамних захисних окулярів.

Приготовлені мийні та дезінфекційні розчини обов'язково повинні відповідати нормам за показником мікробіологічної чистоти [80].

Рідкі відходи, отримані протягом операцій даної стадії відправляються на знешкодження ЗВ19.1 та до місцевої каналізації.

ДР1.2.1 Приготування розчину миючого засобу.

Для приготування миючого розчину використовують водопровідну воду та концентрат синтетичного миючого засобу, дотримуючись вказаного в інструкції співвідношення. Змішування проводять протягом 10 хв, у реакторі змішувачі Р-3 при 100 об/хв.

Такий розчин готують для одного виробничого циклу. Застосовують для щоденного та генерального прибирання приміщення, у процесі прання одягу та мийки та дезінфекції обладнання.

ДР1.2.2 Приготування розчину перекису водню.

Перекис водню готують шляхом розведення у місткості Р-5 водою демінералізованою 33%-го розчину перекису водню зі складу. Отриманий розчин повинен містити перекис водню у концентрації 6%. Рекомендоване співвідношення 8,2:1,3 відповідно.

Надалі застосовують даний розчин для щоденного прибирання приміщення. Об'єм розчину використовують протягом одного виробничого циклу.

ДР1.2.3 Приготування розчину етилового спирту.

Для приготування 70%-го розчину етанолу використовують 96% розчин етилового спирту та води демінералізованої у співвідношення 7:3 у реакторі з мішалкою Р-8.

Приготовлений розчин використовують для генерального прибирання виробничих приміщень та для мийки й дезінфекції обладнання. Приготовлений об'єм використовують в одному виробничому циклі.

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		68

ДР1.3 Підготовка виробничих приміщень

Проведення даної стадії повинно відповідати Наказу МОЗ України від 14 грудня 2001 р. №502 «Методичні рекомендації щодо підготовки виробничих приміщень».

У технологічному процесі виробництва протитуберкульозної вакцини залучені приміщення класів А, В, С та D. Операції, що проводяться у даних приміщеннях, потребують попередження можливої контамінації та забруднення механічними частками, саме тому здійснюють щоденне та генеральне прибирання.

ДР1.3.1 Щоденне прибирання.

Прибирання чистих зон здійснюється закріпленими за даним процесом прибиральниками, які документовано підтверджують проведення очищення відповідно до встановленого підприємством регламенту. Щоденне прибирання проводять двічі на добу.

Прибирання здійснюють вологим способом, із використанням дезінфекційних та мийних розчинів від ДР1.2 (а саме розчин перекису водню 6% та миючі засоби від ДР1.2.2 та ДР1.2.1 відповідно) у розрахунку 100 см³/м² поверхні. Ними оброблюють робочі поверхні столів та обладнання, а також дверні ручки, двері, підвіконня, підлоги [80].

ДР1.3.2 Генеральне прибирання.

Таке прибирання здійснюють один раз на тиждень. Застосовують мийні та дезінфекційні розчини від ДР1.2 (миючі розчини від ДР1.2.1 та розчин етанолу 70% від ДР1.2.3), враховуючи, що необхідна зміна дезінфектора раз у 14 днів. Також рекомендовано використовувати сильні хімічні дезінфектори, як «Фамідез Комбі» на основі бігуанідину та четвертинної амонієвої солі (ЧАС). Обробці підлягають усі види поверхонь, вказаних у ДР1.3.1

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		69

ДР1.4 Підготовка спеціального одягу.

Спеціальний технологічний одяг підготовлюють у згідно з Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001 р. №502 «Методичні рекомендації щодо підготовки технологічного одягу персоналу, який працює у виробничих приміщеннях». Технологічний одяг згідно з ГОСТ Р 52538-2006 повинен характеризуватись мінімальним ворсовідділенням, пилоємністю, пилопроникністю, а також повітропроникністю із показником не нижче 300 м³/(м²·с). Бажана гігроскопічність повинна складати не нижче 7%. Рекомендована тканина – поліефірна із вуглецевими або металевими нитками, а для спідньої білизни та шкарпеток – бавовна.

Відповідно до цього нормативного документа, склад технологічного одягу буде залежати від класу чистоти приміщення, у якому працює персонал [82]:

- Клас D (ISO 8) характеризується наявністю шапочки, халату зі змішаної бавовняної тканини, штанів, куртки з окремим шоломом (капюшоном), взуття та коротких бахіл.
- Клас C (ISO 7) має додатково до видачі підприємством спідньої білизни, шкарпеток, шапочки-сітки; рукавичок, маски для обличчя, коротких або довгих бахіл, комбінезону та шолому з пелериною (за потребою), а також додаткової шапочки та халату зі змішаної бавовни для проміжного переодягання;
- Клас B (ISO 5), відповідно до вказаного вище для класу C, за винятком, що усі компоненти, які були вказані за потребою стають обов'язковими (маски для обличчя, рукавички й т.д.); застосовуються лише високі бахіли, використання штанів стає небажаним, адже рекомендують одягати суцільні комбінезони; обов'язково мають бути додаткові халати та шапочки для проміжного переодягання;
- Клас A (ISO 5) більш характеризується відсутністю персоналу, але у разі обслуговування обладнання або для контролю

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		70

відповідних параметрів, то допускається персонал із засобами індивідуального захисту, вказаними вище, але за умови, що одяг буде окремий, а не той самий, що застосовувався у класі В.

Рекомендована періодичність зміни одягу наступна:

- для класу А – при кожному вході;
- для класу В – при кожному вході або один раз у зміну;
- для класу С – кожного дня або через день;
- для класу D – 1-3 рази на тиждень.

Санітарна підготовка технологічного одягу охоплює наступні операції: огляд, прання, ополіскування, сушіння, пакування, стерилізацію та зберігання одягу [82].

ДР1.4.1 Огляд спеціального одягу

Відповідно до зазначеної вище періодичності, перед подальшою обробкою багаторазового технологічного одягу, проводять візуальний огляд із визначенням стану одягу та ступеню зносу, наявності пошкоджень. На даному етапі рекомендують розділяти за ступенем забрудненості, а також по кольору та елементам: комбінезони, куртки, штани, окремі шоломи, бахіли. У разі необхідності проводять ремонт пошкоджень на одязі. Оглянутий одяг відправляється до прання ДР1.4.2 [82].

ДР1.4.2 Прання спеціального одягу.

Прання проводять у чистих приміщеннях класу D у пральній машині Мп-9. Режим процесу прання залежить виключно від технологічних інструкцій по пранню одягу, враховуючи рекомендацію виробника тканини. Для поліефірних тканин із вуглецевими або металевими нитками рекомендують використовувати температурний режим у 40-60°C, протягом 30 хв [82].

Є обов'язковим використання миючих засобів, отриманих у ДР1.2.1. Додатково – попереднє використання дезінфекційної обробки до прання. Випраний одяг відправляється до ДР1.4.3.

ДР1.4.3 Ополіскування одягу.

Дана операція застосовується, що змити залишки мийного засобу з одягу. Для цього застосовується вода демінералізована від ДР3.2.1. Сполоснутий одяг надходить до ДР1.4.4 [82].

ДР1.4.4 Сушіння одягу

Сушку технологічного одягу проводять у спеціальному обладнанні Сш-10, при температурі 70°C, протягом 30 хв. Конструкція сушильного обладнання повинна виключати ризик контамінації одягу. Якщо одяг призначений до використання у класах чистоти А та В, то рекомендованим є застосування сушильних шаф або зон з однонапрямним потоком повітря, отриманого від ДР2.1.6 та ДР2.1.7. (тобто стерильного повітря). Висушений технологічний одяг відправляється до ДР1.4.5 [82].

ДР1.4.5 Пакування одягу.

Отриманий сухий одяг пакують до пакетів із пергаментного паперу, у тому ж приміщенні, де відбувалась сушка, автоматичними пакувальними машинами Фп-11 для подальшої стерилізації на ДР1.4.6 [82].

ДР1.4.6 Стерилізація одягу.

На даній операції застосовують метод термічної стерилізації при температурі 121°C та тиску у 0,1 МПа протягом 45 хв у стерилізуючому блоці Гф-12. Одяг, який є стерильним, надходить на зберігання на ДР1.4.7 і для подальшого використання на ДР1.1.2 [82].

ДР1.4.7 Зберігання стерильного одягу.

Для зберігання використовують закриті шафи Ш-13 із вішаками для одягу з обов'язковою подачею відфільтрованого повітря від ДР2.1., при температурі не нижче +10°C та не вище +30°C при відносній вологості 50-70% протягом 2-х місяців [78].

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		72

ДР1.5 Підготовка обладнання та комунікацій.

Підготовка обладнання та комунікацій має на меті підтримку чистоти та стерильності апаратів та з'єднувальних елементів до та після проведення технологічного процесу. Від якості проведення даної операції буде залежати і якість майбутньої продукції.

Даний етап підпорядкований згідно з Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001 р. №502 «Методичні рекомендації щодо підготовки технологічного обладнання». Проведення охоплює миття та стерилізацію обладнання із використанням мийних та дезінфекційних засобів із забезпеченням контролю мікробного забруднення.

ДР1.5.1 Мийка та дезінфекція обладнання

Дана операція проводиться до та після проведення технологічного процесу на кожній одиниці обладнання виробництва. Миття проводять із використанням мийного розчину від ДР1.2.1 та розчину етанолу 70% від ДР1.2.3, а також води водопровідної.

Матеріали, які використовують під час даної операції обов'язково надходять на знешкодження, це рідкі (відпрацьовані розчини) і тверді (поролонові губки та серветки без ворсу) відходи до ЗВ19.1 та ЗВ19.3 відповідно.

ДР1.5.2 Ополіскування обладнання

Дану операцію проводять з метою звільнення оброблених поверхонь від залишків мийних та дезінфекційних засобів. Для цього обладнання ополіскують декілька разів демінералізованою водою від ДР3.2.1. Обов'язково проводять контроль якості промивки.

ДР1.5.3 Стерилізація вузлів обладнання.

Стерилізацію здійснюють гострою парою за температури 105-125°C протягом 5-10 хв. Метою операції є звільнення від потенційних мікробних контамінантів, цей показник ретельно контролюється. Утворений конденсат відправляють на знешкодження рідких відходів ЗВ19.1 [83].

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		73

ДР2 Підготовка повітря.

ДР2.1 Підготовка вентиляційного повітря.

Асептика виробництва безпосередньо пов'язана із забезпеченням чистоти повітря, із врахуванням відповідності кількості механічних часток чи мікробних контамінантів до класу чистоти приміщень. Проведення даної стадії повинно відповідати Наказу МОЗ України від 14 грудня 2001 р. №502 «Методичні рекомендації щодо підготовки вентиляційного повітря для виробничих приміщень».

Для очищення повітря використовують фільтри різного ступеню очистки, зокрема фільтри попередньої та тонкої очистки. Встановлені системи очищення направлені на подачу повітря під тиском для подолання опору повітроводів та арматури, видалення механічних часток, мікробіологічних контамінантів, а також регуляцію температури та вологості.

Залежно від класу чистоти та встановлених виробничим регламентом правил, можуть бути використані системи турбулентної вентиляції, або із ламінарним потоком повітря. Другий тип системи більш характерний для приміщень, у яких жорсткі правила підтримки рівня асептики, зокрема у приміщеннях класу А [82].

ДР2.1.1 Забір повітря.

Для забору використовують повітрозбірник Пз-14, вмонтований на висоті 8-10 м. Повітря надходить до ДР2.1.2.

ДР2.1.2 Попередня очистка повітря від механічних часток.

Відібране повітря подається до фільтру попередньої очистки Ф-15 під тиском за допомогою осьового вентилятора. Використовувані тканинні фільтри дозволяють вилучити механічні частинки діаметром більш як 5 мкм.

Відпрацьований фільтрувальний матеріал надходить на очищення на ПВ20.1, а очищена повітря до ДР2.1.3.

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		74

ДР2.1.3 Нагнітання повітря.

Процес нагнітання проходить у ресивері під тиском 0,2 МПа з метою забезпечення подальшого проходження повітря наступними операціями. Повітря надходить спочатку до ДР2.1.4.

ДР2.1.4 Стабілізація показників повітря

Проведення дано операції відбувається також у ресивері. Повітря підігрівається гарячою парою до температури 25-40°C, відбувається стабілізація усіх фізико-хімічних показників. Утворений конденсат надходить на знешкодження рідких відходів на ЗВ19.1. З ресивера повітря знаходить до ДР2.1.5 під тиском у 0,3 МПа.

ДР2.1.5 Очищення повітря на фільтрах I ступеня

Повітря, отримане на даній операції, надходить надалі до приміщень класу D. Саме тому для очистки використовують фільтри НЕРА 11 ступеню очистки, що мають діаметр пор 1,5 мкм та забезпечують ефективність очищення на 98%. Відпрацьовані фільтрувальні матеріали надходять на ПВ17.1, повітря для подальшої очистки – ДР2.1.6 [84, 85].

ДР2.1.6 Очищення повітря на фільтрах II ступеня

Отримане на попередній операції очищене повітря піддається додатковому очищенню на фільтрах Ф-18 НЕРА 12-го ступеня очистки, що забезпечують ефективність очищення на 99,5%. Таке повітря може надходити до приміщень класів чистоти В та С. Відпрацьовані на даній операції фільтрувальні матеріали надходять до ПВ17.1, а повітря для подальшої очистки – ДР2.1.7 [84, 85].

ДР2.1.7 Очищення повітря на фільтрах III ступеня

Повітря від попередньої операції піддається додатковій очистці на фільтрах Ф-19 НЕРА 14-го ступеня очистки, що забезпечує ефективність очистки на 99,995%. Діаметр пор у фільтрувальному матеріалі дорівнює 0,12 мкм. Очищене повітря знаходить до приміщень класів А та В, а

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		75

відпрацьований фільтрувальний матеріал до ПВ17.1 на перероблення [84, 85].

ДР2.2 Підготовка технологічного повітря

Технологічне повітря застосовується безпосередньо у технологічних процесах. Таке повітря повинно бути вільне від сторонньої мікрофлори, щоб буде знижувати ризик контамінації.

ДР2.2.1 Забір повітря

Проводять аналогічно до ДР2.1.1.

ДР2.2.2 Попередня очистка повітря

Проводять аналогічно до ДР2.1.2.

ДР2.2.3 Нагнітання повітря

Проводять аналогічно до ДР2.1.3.

ДР2.2.4 Стабілізація показників повітря

Проводять аналогічно до ДР2.1.4.

ДР2.2.5 Очищення на загальному фільтрі.

Повітря зі стабілізованими фізико-хімічними показниками від ДР2.2.4 піддається очистці на фільтрах Ф-27 НЕРА 11-го ступеня очистки, діаметр пор 0,5 мкм. Дану операцію здійснюють як підготовчу до очистки на індивідуальних фільтрах на ДР2.2.6. Відпрацьовані фільтрувальні матеріали на даному етапі знаходять на переробку ПВ20.1

ДР2.2.6 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі.

На даному етапі використовують фільтри тонкої очистки Ф-28, що забезпечуватимуть ефективність очищення у 99, 9999%, зокрема це фільтр ЛАЇК із діаметром пор від 0,05 мкм, для найбільш важко вловлювальних частинок. Стерилізація проводиться безпосередньо на індивідуальному фільтрі. Отримане очищене повітря надходить до технологічних процесів. Відпрацьовані фільтрувальні матеріали на перероблення до ПВ20.1

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
						76
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДРЗ Підготовка води

На даній стадії проводять очищення води водопровідної з метою отримання води демінералізованої, які надалі надходить до операцій приготування розчинів, а також до процесів приготування поживних середовищ. Вода демінералізована також використовується у подальшому очищенні для отримання води ін'єкційної, які застосовується у приготування фізіологічного розчину, а також у процесах, які потребуються особливого показника мікробіологічної чистоти. Очищена вода, як демінералізована, так й ін'єкційна, повинні відповідати показникам і вимогам відповідних фармакопейних статей.

ДРЗ.1 Попередня фільтрація води

Дана операція здійснюється шляхом очищення водопровідної води на фільтрах попередньої очистки з діаметром пор 0,2 мкм від механічних часток. Очищена вода надходить до подальшого очищення на ДРЗ.2., а відпрацьований фільтрувальний матеріал до ПВ20.2.

ДРЗ.2 Очистка води зворотним осмосом

Для отримання води демінералізованої, що буде відповідати показникам фармакопейної статті ФС2.2.0020.15 «Вода очищена», використовуються осмотичні мембрани у фільтрах Ф-33, Ф-34 та Ф-35, зокрема ацетат-целюозна типу УОФ2500 з діаметром пор 0.001-0,01 мкм. Вода демінералізована відправляється до зберігання ДРЗ.2.1, а також до подальшої очистки для виробництва води ін'єкційної ДРЗ.3. Відпрацьований мембранний фільтр відправляється на перероблення до ПВ20.2 [86].

ДРЗ.2.1 Зберігання води демінералізованої.

Вода демінералізована зберігається у збірнику З-36 протягом трьох діб в умовах, які попереджують ріст мікроорганізмів та запобігають будь-якій іншій контамінації. У разі закінчення терміну зберігання надходить до ЗВ19.1 [87].

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		77

ДР3.3 Отримання води ін'єкційної.

Вода ін'єкційна повинна готуватись так, щоб надалі відповідати показникам фармакопейної статті ФС2.2.0019.15 «Вода для ін'єкцій». Така вода повинна бути апірогенною, не містити антимікробних консервантів або інших добавок.

ДР3.3.1 Очистка води дистиляцією

Отриману від ДР3.2 вода демінералізовану піддають очистці в установці, шляхом багаторазового випарювання та конденсації у випарних колонах Вп-40, Вп-41, Вп-42, Вп-43. Робочий тиск, що підтримується в установці складає 0,6-0,81 МПа, при температурі 100-160°C, які розподілені на випарні колони. Отриману воду ін'єкційну піддаються стерилізації на ДР3.3.2, утворений конденсат надходить на ЗВ19.1 [86].

ДР3.3.2 Стерилізація води ін'єкційної

Процес відбувається з метою очищення отриманої води від можливих мікробних контамінантів. Стерилізацію проводять гострою парою при температурі 120-130°C, протягом 20-30 хв за підтримки тиску 0,12-0,18 МПа у стерилізуючому блоці Гф-47. Стерилізована вода для ін'єкцій надходить до зберігання ДР3.3.3, утворений конденсат – до ЗВ19.1 [86].

ДР3.3.3 Зберігання води ін'єкційної

Вода для ін'єкцій зберігається у збірнику З-44 при температурі 65-75°C до моменту використання за умови постійної циркуляції протягом 1 доби. Умови повинні також зводити до мінімум можливість контамінації мікроорганізмами, або будь-якої іншої. Вода надходить зі збірника до використання у ДР4.1.2, ДР5.1. [88]

ДР4 Підготування ампул до заповнення

Процес підготування ампул до заповнення направлений на очистку їх від мікробних та механічних часток, щоб запобігти зараженню готової продукції.

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		78

ДР4.1 Мийка ампул

Попередником до даної стадії належить набір ампул до перфорованих касет, виготовлених із нержавіючої сталі. Якщо ампули великі, то їх набирають вручну, а дрібні ампули (до 5 мл) розміщують до касет автоматично за допомогою машини Резепіна АВ-50. Наповнені ампулами касети знімаються вручну та передаються до мийки – зовнішньої та внутрішньої [86].

ДР4.1.1 Зовнішня мийка ампул

В апараті для зовнішньої мийки ампул АВ-51, над касетами, наповненими ампулами, розміщується душовий пристрій. За допомогою такого пристрою на ампули подається підігріта до 60°C демінералізована вода. Касета при цьому обертається, що забезпечує рівномірне обмиття ампул [86].

По завершенню процесу обмиття ампули надходять до ДР4.1.2., рідкі відходи до ЗВ19.1, можливі тверді відходи у разі пошкодження цілісності ампул до ЗВ19.3.

ДР4.1.2 Внутрішня мийка ампул

Проходження даної операції здійснюється параконденсаційним способом у апараті АВ-52 – через кипіння води ін'єкційної у ампулі при температурі 80°C при тиску 0,14МПа відбувається інтенсивна обробка стінок ампул з відшаруванням частинок від них, а через подальше витіснення рідини – виведення механічних часток. Спочатку ампули заповнюються водою від ДР3.3.3 і паром, а шляхом конденсації створюється вакуум, і вже потім подається нагріта вода [86].

Очищені ампули подаються до стерилізації на ДР4.2, а рідкі відходи до ЗВ19.1, можливі тверді відходи у разі пошкодження цілісності ампул до ЗВ19.3.

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		79

ДР4.2 Стерилізація ампул

Даний етап поєднує у собі операції сушки та стерилізації внаслідок використання тунельної сушарки Сш-53, у якій касети з ампулами від ДР4.1.2 рухаються по транспортеру при нагріванні інфрачервоними променями у сушильній частині до 170°C, а у тій, що стерилізує, – 300°C [82].

Такий метод стерилізації буде забезпечувати мінімальне потрапляння сторонніх часток до ампул, що є важливим при подальшій перевірці ампул на механічні вклучення ДР4.3.

ДР4.3 Контроль механічних вклучень

Ампули з партії піддають перевірці можливого забруднення механічними частками, або мікробними контамінантами. У ході перевірки, відбраковані партії ампул надходять на повторну підготовку від ДР4.1.1 і так далі. Тверді відходи, у разі пошкодження цілісності ампул – до ЗВ19.3. Ампули, що пройшли перевірку – до заповнення ТП11.1, ТП11.2

ДР5. Підготовка розчинника

Відповідно до ФС.3.3.1.0018.15 «Вакцина туберкульозна БЦЖ (жива)», у комплекті з ампулою з ліофілізованою вакциною йде ампула з 0,9% розчину хлориду натрію для ін'єкцій. Даний ізотонічний розчин призначений для розведення вакцини – утворення гомогенної грубодисперсної суспензії для подальшого введення вакцини.

ДР5.1. Приготування розчину для ін'єкцій

Приготування розчину проводять в асептичних умовах масо-об'ємним способом за допомогою дозаторів Д-54 та Д-55. Спочатку частину натрію хлориду, що відповідає фармакопейній статті ФС.2.2.0014.15, розчиняють у частині води для ін'єкцій від ДР3.3.3, далі доводять нею до потрібного об'єму та перемішують у реакторі Р-56. Перемішування здійснюють якірними лопатевими тихохідними мішалками при 0,2-1,3 об/с. Необхідна концентрація натрію хлориду – 0,9% (9 г хлориду натрію на 1 л води ін'єкційної) [89].

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						80
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Приготовлений розчин надходить до фільтруючої стерилізації ДР5.2, рідкі відходи до ЗВ19.1.

ДР5.2. Фільтрування розчину

Фільтрування розчину проводять із використанням друк-фільтрів із трьохступеневою фільтрацією, що полягає у використанні фільтрувальних матеріалів із діаметром пор 5 мкм (Ф-61), 0,65 мкм (Ф-62) та 0,2 мкм (Ф-63) послідовно. Це дозволить звільнити розчин від механічних часток, що могли потрапити разом із використовуваними кристалами солі натрію хлориду. Утворений розчин надходить на зберігання до ДР5.3. Рідкі та тверді відходи надходять до ЗВ19.1 та ЗВ19.3 відповідно, а відпрацьовані фільтри – до ПВ20.1 [89, 90].

ДР5.3. Зберігання розчину для ін'єкцій

Відфільтрований розчин натрію хлориду 0,9% зберігають до моменту наповнення ампул ТП11.1.2 у збірнику протягом 3 місяців, при кімнатній температурі (не вище 25°C) в асептичних умовах. По закінченню терміну зберігання, залишковий розчин надходить до ЗВ19.1 [89].

ДР6. Підготовка поживного середовища

Приготування поживного середовища проводять у реакторі, до якого через об'ємно-вагові дозатори додаються компоненти. Було обрано як поживне середовище, що буде застосовуватись у виробничому культивуванні *M.bovis* BCG-1, модифіковане середовище Сотона відповідно до патенту Інституту експериментальної та ветеринарної клінічної медицини [91].

Дане ПС забезпечує більший вихід біомаси, ніж прототип, а також є рентабельним в умовах української економіки, адже дорогі імпортні компоненти були замінені на аналоги вітчизняного виробництва, наприклад, амінокислота L-аспарагін була замінена на глікокол (амінооцтову кислоту). У порівнянні з стандартним складом середовища Сотона, з модифікованого було також вилучено детергент твін-80, адже його концентрацію потрібно

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		81

суворо контролювати на етапі виробничого культивування ТП9 – підвищена концентрація може призводити до інгібування росту та утворення КУО. Бажаним при приготуванні поживного середовища є мінімальне співвідношення початкових концентрацій джерел азоту і вуглецю – глікоколу та гліцерину у модифікованому середовищі відповідно – адже за такої умови приріст біомаси буде найбільшим [91].

ДР6.1. Розчинення компонентів середовища

До реактора через об'ємно-вагові дозатори (Д-66 для органічних складових та Д-67 для неорганічних) зі складу до реактора Р-68 подаються наступні компоненти (концентрації у перерахунку на 1 л середовища):

1. Залізо лимоннокисле аміачне – 0,05-0,06 мг/л
2. Глікокол (амінооцтова кислота) – 5-6 мг/л
3. Амоній лимоннокислий – 3-4 мг/л
4. Калій фосфорнокислий двозаміщений – 4,5-5 мг/л
5. Магній сірчанокислий семиводний – 3-4 мг/л
6. Гліцерин – 50-60 мг/л

Від ДР3.2.1 для приготування подається вода демінералізована. Змішування проводять підігрівуючи воду до 45-50°C. Розчинені компоненти подаються до ДР6.2, а рідкі відходи до ЗВ19.1

ДР6.2. Охолодження розчину

Наступним етапом є охолодження розчину до кімнатної температури (20-25°C) шляхом подання до рубашок холодоагенту. Утворений конденсат надходить до ЗВ19.1, а охолоджене середовище до ДР6.3.

ДР6.3. Стабілізація кислотності середовища

Після охолодження, проводять доведення кислотності середовища до оптимального для вирощування мікобактерій БЦЖ – 6,5, шляхом подачі аміачного розчину 20%-го зі складу. Після стабілізація середовище надходить до ДР6.4. Відпрацьований аміачний розчин до ЗВ19.1.

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		82

ДР6.4. Фільтрування середовища.

За для звільнення від твердих частинок, що не розчинились у процесі приготування середовища проводять процес фільтрування через подачу середовища насосом Н-69 до друк-фільтра Ф-70 (який призначений для очистки тонкодисперсної суспензії з низькою концентрацією твердої фази) та фільтрувальних матеріалів із діаметром пор 0,2 мкм під тиском 0,1МПа. Відфільтроване середовище подається до ДР6.5, тверді відходи – до ЗВ19.3, а відпрацьований фільтрувальний матеріал до ПВ20.1.

ДР6.4. Стерилізація середовища.

Стерилізацію проводять шляхом подачі середовища до колони швидкісного нагріву К-72 насосом Н-71 , розчин при цьому нагрівається до 120°C протягом 20 хв, та теплообмінні апарати Т-74 та Т-75, що забезпечують рекуперацію тепла. Після завершення процесу стерилізації готове середовище протягом трьох діб при температурі 37°C перевіряється на мікробіологічну стерильність, і тільки після цього проводиться розлив до виробничих колб, по 0,1-0,11 л середовища до кожної, для культивування мікобактерій на стадії ТП9. Утворений конденсат надходить до ЗВ19.1.

ДР7. Підготовка поживного середовища для активації культури

Для активації культури мікобактерій, відповідно до використовуваного патенту, застосовують картопляно-гліцеринове середовище Павловського. Це пов'язано із тим, що першим середовищем для мікобактерій БЦЖ було гліцериново-картопляне середовище із додаванням жовчі. Саме тривале пасажування на ньому дало мутацію у геномі мікобактерій бичачого туберкульозу та появу вакцинного субштаму. На разі, культивування на такому середовищі при активації культури запобігає появі сторонніх мутацій [93, 94].

Дане середовище можна застосовувати у відновленні музейної культури для отримання культури мікобактерій для пасажування.

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		83

ДР7.1. Підготовка картоплин.

ДР7.1.1. Миття картоплин

Перед очищенням картопляні клубні ретельно промивають водопровідною водою та витирають до сухості. Рідкі та тверді відходи від даної операції надходять до ЗВ19.1 та ЗВ19.3, а вимита картопля до ДР7.1.2.

ДР7.1.2. Очистка картоплин

Очищення вимитої картоплі від шкірки здійснюють прожареним ножем, зрізаючи обидва полюси картоплини. Тверді рештки надходять до ЗВ19.3, очищена картопля до ДР7.1.3.

ДР7.1.3. Виготовлення картопляних клинів

Дана операція проводиться із використанням стерильних борів, якими вирізають картопляні циліндри довжиною 5-6 см, і шириною, що будуть відповідати діаметрам пробірок. Залишки від картоплі надходять до ЗВ19.3, а картопляні клини до ДР7.2.

ДР7.2. Занурення картоплі у гліцерин

До стерильних пробірок із перетяжкою у нижній частині П-77 зі складу наливають через дозатор Д-76 гліцеринову воду об'ємом 1 мл зі складу із концентрацією гліцерину 0,5% та рН=7,0-7,2. Далі до пробірок кладуть картопляні клини від ДР7.1.3 так, щоб нижня частина клину торкалась гліцеринової води. Приготовлене середовище надходить до стерилізації ДР7.3, рідкі та тверді відходи до ЗВ19.1 та ЗВ19.3 відповідно.

ДР7.3. Стерилізація середовища

Приготовлене середовище для знезараження від сторонньої мікрофлори надходить на стерилізацію до стерилізуючого блоку Гф-78 при температурі 110°C протягом 10 хв. Відразу після стерилізації пробірки розміщують під нахилом, що дозволяє зберегти вологість. Стерильність пробірок та колб із середовищем контролюють шляхом витримки у термостаті протягом двох діб. Відбраковані середовища надходять на знезараження до ЗВ19.1 та ЗВ19.3, чисті середовища до ДР8.1 та ДР8.2.

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		84

ДР8. Підготовка посівного матеріалу

ДР8.1. Відновлення музейної культури

Культуру з ампул зі штамом *M. bovis* BCG-1 пересівають у 7 пробірок із картопляно-гліцериновим середовищем Павловського від ДР7.3 П-79 (картопляний клин у пробірці, занурений у 1 мл гліцеринової води). Після посіву культури, ватно-марлеві пробки обпалюють у полум'ї пальника, промочують у парафіні та закривають. Пробірки з посіяними культурами інкубують у термостаті Т-80 протягом 24 діб при температурі 38°C. Процес проводять в асептичних умовах, попереджуючи контамінації. Рідкі та тверді відходи від даної операції надходять до ЗВ19.1 та ЗВ19.3, утворений некондиційний матеріал – нестерильна біомаса – надходить на знешкодження до ЗВ19.2 [5].

ДР8.2. Пасажування культури у колбах.

ДР8.2.1. Отримання посівного матеріалу I генерації.

Культуру, дотримуючись асептичних умов, переносять із 7 пробірок від ДР8.1 П-81 стерильними лопатками до 7 колб із рідким модифікованим середовищем Сотона від ДР6.5 об'ємом 0,1 л Кл-82 (по 3-4 лопатки до кожної колби). Після посіву проводять такі ж операції, як у ДР8.1: ватно-марлеві пробки обпалюють у полум'ї пальника, змочують у парафіні та закривають колби. Культивування проводять при температурі 38°C у термостаті Т-84, протягом 7 діб. Таким чином вирощують матрикс №1 для наступного пересіву у ДР8.2.2. Тверді відходи, відпрацьоване середовище та некондиційний матеріал у випадку зараження надходить до ЗВ19.2.

ДР8.2.2. Отримання посівного матеріалу II генерації.

Вирощену на поверхні рідкого середовища біомасу від ДР8.2.2 в асептичних умовах переносять ракеткою на поверхню свіжого поживного середовища Сотона у 7 колбах від ДР6.5 об'ємом по 0,1 л у кожній. Закупорювання колб проводять як у ДР8.1 та ДР8.2.1. Культивування проводять також при 38°C протягом 7 діб. Отримана біомаса надходить до

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		85

ТП9. Тверді відходи, відпрацьоване середовище та некондиційний матеріал у випадку зараження надходить до ЗВ19.2.

ТП9. Виробниче культивування

Використання реакторів до 20 л у виробництві вакцини є стандартом у процесі накопичення біомаси мікобактерій БЦЖ. Проте даний спосіб отримання вакцинного матеріалу для щадної первинної імунізації не є цілком зручним. Для вакцини БЦЖ найважливішими показниками є рівень вмісту у ній життєздатних мікобактеріальних клітин, гомогенність, дисперсність, які будуть надалі визначати її реактогенність і пов'язану із нею частоту поствакцинальних ускладнень. Тому більш результативним є використання виробничих колб на 0,5 л. Мікобактерій ростуть на поверхні поживного середовища. При вирощуванні у колбах можна контролювати ріст культури мікроорганізмів, та її відповідність показникам: мікобактеріальна культура повинна утворювати суху зморшкувату плівку кольору слонової кістки. Даний метод дозволить легко відбраковувати некондиційний матеріал – культуру з вологою, гладкою, розірваною на острівки плівкою – залишаючи лише чисту активну культуру живих мікобактерій, що неможливо здійснити із високою точністю при використанні культивування у промислових ферментерах.

У стерильні колби КЛ-86 (7 шт.) зі складу вносять модифіковане середовище Сотона від ДР6.5 об'ємом 0,11 л з дозатору Д-87. Після засіву, колби закривають стерильними ватно-марлевими пробками, змоченими у парафіні. Вирощування проводять підтримуючи температуру 38°C, pH=6,5 у термостаті Т-88. Для приготування вакцини БЦЖ потрібна культура віком 11 діб [5].

Додатково проводять мікроскопічний контроль чистоти препарату по Цилію-Нільсену, а також підрахунок кількості колоній посіву проб на середовищі Левенштейна-Йенсена [17].

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
						86
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Рідкі та тверді відходи до ЗВ19.2 (оскільки був контакт із патогенною мікрофлорою), некондиційний матеріал до ЗВ19.2 Утворена мікобактеріальна біомаса у всіх промислових колбах (окрім відбракованих із некондиційною продукцією) зливається в одну стерильну колбу об'ємом 1 л та надходить на очищення до ТП10.1.

ТП10. Очищення та відділення біомаси

Біомаси мікобактерій БЦЖ із колб піддають очищенню від поживного середовища, а також утворених агрегатів мікобактерій.

ТП10.1. Фільтрація мікробної біомаси

Дана операція проводиться з метою відділення від мікобактеріальної культури поживного середовища, що є дуже важливим у подальшому виготовленні протитуберкульозної вакцини. Попередньо вміст усіх колб Кл-87 – середовища з накопиченою біомасою – зливають у стерильних умовах у стерильну посудину. Найкраще використати у такому разі стерильні виробничі колби на 1 л. Для власне процесу фільтрування використовують закриті нутч-фільтри, або їх ще називають друк-фільтри Ф-90, із влаштованим мембранним трековим фільтрувальним матеріалом (виготовленим на основі фільтрувальної тканини – лавсану) із діаметром пор у 0,2 мкм, при робочому тиску у 0,3 МПа. Закритий тип конструкції та надлишковий тиск всередині апарату створюватимуть асептичні умови для процесу фільтрування та попереджуватимуть ризик контамінації біомаси. Вибір даної конструкції базується і на тому, що фільтрувати доводиться невеликий об'єм (приблизно 0,7 л матеріалу від виробничого культивування), а також на можливості багаторазового використання фільтру із його промивкою та стерилізацією, у зв'язку з патогенністю мікобактерій. Діаметр пор фільтрувальної перегородки було обрано саме такий, адже мікобактерії туберкульозу бичачого типу є найменшими серед усіх мікобактерій туберкульозного комплексу [94].

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		87

У більшості сучасних виробництв вакцини БЦЖ допускають використання одноразових нероз'ємних капсульних фільтрів із вмонтованою мембранною перегородкою. Їх використання є доцільним, адже є цілком та повністю одноразовим, що забезпечує захист навколишнього середовища від потрапляння мікобактерій, та самі мікобактерії від контамінації, як це можливо при використанні багаторазових фільтрувальних конструкцій. На жаль, в Україні це малопоширений спосіб. Тому варто зосереджувати увагу на використанні самої нутч-фільтрів.

Відпрацьований фільтрувальний матеріал можна вважати одноразовим, тому він відправляється на ЗВ19.2, рідке середовище (фільтрат) до ЗВ19.2 також, адже був контакт із мікобактеріями, які є патогенними. Відфільтрована біомаса до ТП10.2.

ТП10.2. Промивання середовищем висушування

Для промивання біомаси у резервуарі фільтру Ф-90 використовують розчин стабілізатора – натрію глутамату 1,5% зі складу. При цьому, лопатева мішалка, з частотою обертів $0,21 \text{ с}^{-1}$, друк-фільтру забезпечить звільнення пор від можливого потрапляння клітин мікобактерій. Відпрацьований розчин надходить до ЗВ19.2, а промита біомаса до ТП10.3.

ТП10.3. Охолодження біомаси

На даному етапі проводять охолодження біомаси до температури 4°C та витримують протягом 30 хв у холодильнику. Охолоджена біомаса до ТП10.4.

ТП10.4. Розтирання мікробної біомаси

Охолоджену біомасу на даному етапі піддають розтиранню в флаконах Фл-91 з металевими бусами на шуттель-апараті Ша-92 при температурі $10-18^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хв при частоті 75 об./хв до отримання однорідної біомаси. Біомасу мікобактерій піддають ТП10.5.

ТП10.5. Розведенням стабілізатором

Дане розведення проводять шляхом подачі розчину натрію глутамату концентрацією 1,5% зі складу до флакону Фл-94 із біомасою через дозатор Д-

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		88

93 для отримання суспензії з концентрацією мікобактеріальних клітин 50 мг/мл. Дана операція є проміжною до отримання точної концентрації для вакцини БЦЖ. Відпрацьовані розчини надходять до ЗВ19.2, утворену суспензію центрифугують на ТП10.6.

ТП10.6. Центрифугування суспензії

Флакони із суспензією мікобактерій БЦЖ по 0,25 л центрифугують при 2000 об./хв протягом 15-20 хв на лабораторній центрифугі Цл-95. Надосадова рідина із мікобактеріями БЦЖ надходить до ТП10.7, а осад до ЗВ19.2.

ТП10.7. Розведення стабілізатором

До отриманої надосадової рідини (супернатанту 50 мг/мл) мікобактерій БЦЖ від ТП10.6, яку зливають із флаконів Фл-96 до збірника З-98, додають розчин натрію глутамату зі складу через дозатор Д-97 для отримання суспензії клітин вакцини з остаточною концентрацією 0,5 мг/мл для подальшої ліофілізації. Дана концентрація є відмінною від тої, що використовується для отримання вакцини БЦЖ (1 мг/мл). Вона підібрана з метою отримання вакцини для щадної первинної імунізації зі зменшеним антигенним навантаженням – 0,5 мг БЦЖ у 1 мл складатимуть 20 доз по 0,025 мг препарату у 0,1 мл (це зменшить кількість життєздатних клітин у проміжку 500-750 тис. клітин, на відміну від звичайної вакцини, де кількість клітин від 500 тис. до 1,5 млн.). Точність розведення перевіряють фотоелектроколориметром. Рідкі відходи йдуть до ЗВ19.2, а готова суспензія для вакцин до ТП11.1.

ТП11. Наповнення ампул

Наповнення ампул здійснюється шприцевим методом за допомогою установки зі спеціальним поршневым дозатором, що забезпечуватиме точне дозування. Це дуже важливо у виробництві вакцин: неточне дозування може призводити до зміни кількості мікобактеріальних клітин у вакцині та поствакцинальних ускладнень.

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		89

При наповненні ампули капіляр залишається чистим, що важливо при використанні в'язких розчинів. Використання інертного газу при наповненні підвищує стабільність ін'єкційних препаратів, шляхом обмеження контакту речовини з атмосферою приміщення: спочатку в ампулу подається інертний газ, який витісняє повітря, далі подається ін'єкційний розчин дозатором, а після – знову інертний газ [86].

ТП11.1.1. Наповнення ампул біомасою зі стабілізатором

Вакцинна суспензія надходить від ТП10.7 до поршневого дозатора АВ-99, який здійснює наповнення стерильних ампул із темного скла ШП6-НС-1 від ДР4.3. Попередньо до ампул через дозатори надходить інертний газ для витіснення повітря. Поршневий дозатор наповнює ампулу 1 мл вакцинної суспензії. Наповнена ампула відправляється в атмосфері інертного газу на ліофілізацію. Рідкі та тверді відходи від даної операції надходять до ЗВ19.2.

ТП11.1.2. Наповнення ампул розчинником

Операція здійснюється аналогічно до ТП11.1, але з використанням стерильних ампул із прозорого скла від ДР4.3 та розчину натрію хлориду 0,9% від ДР5.3. Поршневий дозатор АВ-100 подає 2 мл розчину до ампули. Рідкі та тверді відходи надходять до ЗВ19.1 та ЗВ19.3 відповідно, а наповнені ампули до ТП14.2.

ТП12. Заморожування препарату.

Дана стадія призначена для швидкого заморожування продукту для подальшої ліофілізації. Температура заморожування повинна бути нижчою за точку евтектики, що рідка фаза швидко перейшла у тверду фазу – лід. Враховуючи, що температура замерзання стабілізатора глутамату натрію моногідрату -58°C (він використовується у якості ліопротектору), було обрано для даної стадії температуру у -60°C . Заморожування проводили протягом 1 години у сублімаційній сушарці Сш-101. Рідкі відходи від даної стадії надходять до ЗВ19.1, а охолоджений препарат до ТП13.1 [17, 97].

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		90

ТП13. Ліофілізація препарату

Даний процес є найбільш визначним у виробництві вакцинних препаратів. Основою ліофілізації є сублимаційне висушування, яке полягає у переході води із замороженого стану у газоподібний, без проходження рідкої фази. Це дозволить зберегти біологічний матеріал – виживаність бактеріальної культури, а також забезпечить рівень асептики за рахунок висушування препарату у первинній тарі (у нашому випадку – ампулах) із точним дозуванням та забезпечення герметизації в атмосфері азоту, або під вакуумом [17, 95].

Керується даний процес наступними рівняннями:

$$G_1 = G_2 \cdot \frac{100 - w_2}{100 - w_1}$$

$$G_2 = G_1 \cdot \frac{100 - w_1}{100 - w_2}$$

$$W = G_1 - G_2,$$

де W – маса води, що видаляється при висушуванні;

G_1 – маса води біомаси;

G_2 – маса сухої біомаси,

w_1 – початкова вологість;

w_2 – кінцева вологість.

Оскільки, одна ампула повинна містити після ліофілізації $G_2 = 0,5$ мг біомаси мікобактерій БЦЖ, початкова вологість клітини становить $w_1 = 85\%$, а кінцева $w_2 = 2\%$, то:

$$G_1 = 0,5 \cdot \frac{100 - 2}{100 - 85} = 3,27 \text{ мг}$$

І звідси:

$$W = 3,27 - 0,5 = 2,77 \text{ мг}$$

Отже, при ліофілізації з однієї ампули видалиться 2,77 мг клітинної води.

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
						91
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ТП13.1. Первинне висушування.

Заморожений препарат від ТП12 на даній стадії ще протягом 4 годин знаходиться при температурі -60°C . Після цього температура починає підвищуватись, спочатку до -30°C , а потім до 0°C . Тиск, який при цьому підтримується в апараті складає 10 Па, що забезпечує вакуум для асептичних умов та вільної дифузії парів рідини від замороженої маси продукту до охолодженої поверхні конденсатора. Увесь процес підвищення температури до 0°C триває 20 год. За цей час вільна вода у формі льоду видаляється із препарату [17, 94].

Рідкі відходи, що утворюються на даному етапі надходять до ЗВ19.1, а препарат потрапляє до наступного етапу висушування ТП13.2.

ТП13.2. Вторинне висушування.

Даний етап полягає у видаленні зв'язаної води у кількості 5-15% внаслідок підвищення температури до 25°C подачі тепла від нагрівальних елементів, розміщених в полиці сублиматора із препаратом, що підтримується ще протягом 1 години. Атмосфера вакууму також зберігається (тиск у 10 Па). Залишкова вологість не повинна перевищувати 3-5%. Ліофілізований препарат надходить до запаювання на ТП14.1. Рідкі відходи від даної операції до ЗВ19.1 [17, 95].

ТП14. Запаювання ампул.

ТП14.1. Запаювання ампул з вакциною

По завершенню висушування, ампули із ліофілізованою вакциною запаюють газовим пальником АВ-103 в області перетяжки безпосередньо у камері сублиматора під вакуумом ($P=12$ Па). Запаєні ампули надходять до ТП16, пошкоджені ампули – некондиційний матеріал – надходять до ЗВ19.2 [17, 86].

ТП14.2. Запаювання ампул з фізіологічним розчином.

Ампули із розчином натрію хлориду 0,9% запаюються безпосередньо після етапу наповнення ТП11.2 в атмосфері інертного газу (поток азоту), що

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						92
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

забезпечуватиме асептичні умови, газовим пальником АВ-102 в області перетяжки. Пошкоджені ампули надходять до ЗВ19.3, рідина з них до ЗВ19.1. Готові ампули до ТП15 [86].

ТП15. Стерилізація ампул

Ампули із фізіологічним розчином додатково стерилізують насиченою водяною парою при тиску 0,12 МПа, температурі 120°C протягом 20 хв у стерилізаторі для ампульного виробництва АВ-104. Такий метод дозволяє стерилізувати препарат у первинній упаковці, що буде знижувати ризик контамінації. Стерилізовані ампули відправляються до ТП16, утворений конденсат – до ЗВ19.1 [86].

ТП16. Перевірка герметичності ампул.

Ампули з вакциною від ТП14.1 та ампули із фізіологічним розчином від ТП15, перевіряють на герметичність та відбраковують пошкоджені ампули. Для цього використовують метод забарвлення розчином метиленового синього (С=0,0005%). Для цього гарячі ампули від ТП15 поміщають у ванну КС--106 із забарвленим розчином: всередині ампул створюється розрідження через швидке охолодження, і у разі негерметичності – розчин метиленового синього проникає всередину ампул. При зануренні ампул із вакциною, які не піддавались стерилізації, у забарвлений розчин, в апараті АВ-105 створюють тиск у 120 кПа [86].

У обох випадках відбраковуються ампули, до яких потрапив метиленовий синій. Пошкоджені ампули з фізіологічним розчином надходять до ЗВ19.3, а ампули з вакциною до ЗВ19.2 на знезараження.

Запаяні ампули, що пройшли перевірку надходять до ТП17.

ТП17. Контроль та стандартизація

Із партій ампул, як із вакциною, так і з фізіологічним розчином відбирають декілька ампул на перевірку препарату відповідності фармакопейним статтям ФС. ФС.3.3.1.0018.15 (для вакцини БЦЖ) та ФС2.2.0014.15 (для розчину натрію хлориду 0,9%).

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						93
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

У разі невідповідності вмісту ампул, які перевіряються, відбраковують усю партію – ампули з вакцинами до ЗВ19.2, ампули з фізіологічним розчином до ЗВ19.1 та ЗВ19.3. Якщо ж вміст ампул відповідає показникам, або вони у межах вказаних норм – партії ампул із вакциною та фізіологічним розчином надходять до ПМВ18.1.2, а відпрацьовані ампули – з вакциною до ЗВ19.2, а розчином натрію хлориду до ЗВ19.1. та ЗВ19.3.

ПМВ18. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ18.1. Маркування ампул.

ПМВ18.1.1. Нанесення інформації на клейку стрічку.

Друкарською фарбою зі складу на друкарському апараті на самоклеючі етикетки зі складу наносять наступну інформацію:

- Назву препарату («Вакцина БЦЖ ліофілізована (жива)» та «Натрій хлорид. Розчин ізотонічний 0,9%» на ампули з вакциною та фізіологічним розчином відповідно);
- Виробник (для етикеток для ампул з вакциною);
- Кількість доз, масу (для етикеток для ампул з вакциною);
- Об'єм розчину (для етикеток для ампул із фізіологічним розчином);
- Серію, що відповідає даті виготовлення;
- Термін придатності.

На моніторі машини обов'язково перевіряють правильність інформації, що наноситься на етикетки. Відбраковані етикетки надходять до ЗВ19.3, рідкі відходи до ЗВ19.1.

ПМВ18.1.2. Розміщення наклейок на ампулах

На партії ампул з вакциною та фізіологічним розчином, що надходять від ТП17, наносять етикетки від ПМВ18.1.1 – етикетки з інформацією про вакцину на ампули з вакцинами, а етикетки з інформацією про фізіологічний розчин на ампули розчином натрію хлориду 0,9%. На моніторі апаратів УС-107 та УС-108 перевіряють відповідність етикеток що наносяться з

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		94

ампулами, що поступають на етикетування. У разі помилки ампули з етикетками відбраковуються і надходять до ЗВ19.2 та ЗВ19.3. Партії ампул з етикетками до ПМВ18.2.

ПМВ18.2. Фасування у контурну чарункову упаковку.

Контурні чарункові упаковки формують в апаратах для блістерних упаковок ампул і флаконів ФП-109 та ФП-110, шляхом подачі матеріалу – полівінілхлориду – під температуру 145-160°C, під тиском у 0,4-0,6 МПа. Фасування здійснюють тим же апаратом по 5 ампул з вакциною/фізіологічним розчином до відповідної чарункової упаковки, що надходять до ПМВ18.3. Відбраковані чарункові упаковки без ампул від операції до ЗВ19.3.

ПМВ18.3. Пакування до вторинної упаковки

Контурні чарункові упаковки з ампулами вкладаються до вторинної упаковки (картонної коробки) зі складу з інформацією, вказаною у пункті 4.1 даного розділу апаратом для пакування контурних упаковок у картонні упаковки (по одній чарунковій упаковці з ампулами з вакциною та з фізіологічним розчином). До вторинної упаковки також вкладають інструкцію з медичного застосування зі складу з інформацією відповідно до пункту 4.1. даного розділу, а також скарифікатор зі складу автоматично апаратом ФП-111. Картонні упаковки з препаратом та розчинником надходять до ПМВ18.4, а тверді відходи від операції до ЗВ19.3.

ПМВ18.4. Пакування до групової тари.

Групова тара представлена картонною коробкою, у якій розміщують 20 картонних коробок із препаратом вручну ФП-112. Коробки з продукцією обклеюється клейкою стрічкою, всередину попередньо вкладається пакувальний талон (1 шт.), наносять на коробки маркувальні елементи, і вони надходять на склад, де зберігаються при температурі у 2-8°C до моменту реалізації. Тверді відходи від операції надходять до ЗВ19.3.

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		95

ЗВ19. Знешкодження та знезараження відходів.

Рідкі, тверді, повітряні відходи, а також некондиційна продукція з виробництва обов'язково має бути знезараженою.

ЗВ19.1. Знешкодження рідких відходів.

Залишкові, відпрацьовані мийні та дезінфекційні розчини після санітарної обробки виробництва, промивні води від ополіскування одягу, обладнання, а також конденсат від виробничих процесів, деякі нейтральні відпрацьовані розчини зливаються у єдиний збірник, для нейтралізації кислотності до $pH=7,0$ розчином їдкого натру чи соляної кислоти, а вже після проводять злив до каналізаційної системи.

ЗВ19.2. Знешкодження мікобактерій.

На даний етап надходять усі матеріали, які є безпосередньо мікобактеріальною продукцією (некондиційний посівний матеріал від ДР8.1, ДР8.2.1, ДР8.2.2; відбракована біомаса від ТП9), або контактували з мікобактеріями (сюди відносять, зокрема глутамат натрію, який використовувався для промивки культури мікобактерій; пошкоджені ампули з вакцинним матеріалом, одноразові фільтри для відділення мікобактерій тощо). Шляхом термічної стерилізації насиченої водяною парою при температурі $126^{\circ}C$ протягом 30 хв проводять знезараження відходів, які надалі розподіляються до каналізація (якщо відходи рідкі), або на знешкодження ЗВ19.3 (якщо відходи тверді).

ЗВ19.3. Знешкодження твердих відходів

Твердий матеріал, як пошкоджені на стадіях виробництва або знезаражені заповнені ампули, рукавички, бракована вторинна упаковка, пробки, одноразові знезаражені фільтри тощо., підлягають утилізації на місцевому сміттєзвалищі.

ЗВ19.4. Знешкодження повітряних викидів.

Повітряні відходи виробництва знешкоджуються на фільтрах при виході із апаратів та направляються до атмосфери через труби.

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
						96
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ПВ20. Переробка відходів

ПВ20.1. Відновлення тканинних фільтрів

Відпрацьовані тканинні фільтри для відновлення замочують у гарячій воді та очищують дезінфекційними розчинами і знову включають у виробництво.

ПВ20.2. Відновлення мембранних фільтрів

Мембранні фільтри відновлюють шляхом відмивання у лужних (рН=11,5-12) та кислих розчинах (рН=2,5-3) із подальшою обробкою дезінфекційними розчинами. Відновлені мембранні фільтри знову включають у виробництво.

4.4. Матеріальний баланс

Матеріальний баланс виробництва вакцини БЦЖ розраховують на один цикл – на один процес виробничого культивування, що передбачає отримання серії з 1940 упаковок з п'ятьма комплектами вакцинного препарату: 5 ампул з ліофілізованою вакциною БЦЖ по 0,5 мг клітин мікобактерій у кожній (20 доз по 0,025 мг), а також 5 ампул з 2 мл розчину натрію хлориду 0,9% [96]. Баланс складається за наступними ключовими стадіями та операціями (Табл. 4.3, Табл. 4.4):

- ДР5. Підготовка розчинника;
- ДР6. Підготовка поживного середовища;
- ДР7. Підготовка поживного середовища для активації культури;
- ДР8. Підготовка посівного матеріалу (а саме ДР8.1. Відновлення музейної культури, ДР8.2.1. Отримання посівного матеріалу I генерації, ДР8.2.2. Отримання посівного матеріалу II генерації);
- ТП9. Виробниче культивування;
- ТП10. Очистка та виділення біомаси (а саме ТП10.1. Фільтрація мікробної маси, ТП10.5. Розведення стабілізатором, ТП10.6. Центрифугування, ТП10.7. Розведення стабілізатором);

					<i>ДП 6207. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		97

- ТП11. Наповнення ампул;
- ТП13. Ліофілізація препарату;
- ПМВ18. Пакування, маркування та відвантаження.

Таблиця 4.3

Матеріальний баланс технологічного процесу виробництва вакцини БЦЖ.

Частина 1.

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
	кг	шт	л		кг	шт	л
ДР5. Підготовка розчинника							
Натрій хлорид	0,18			Фізіологічний розчин, 0,9%			19,46
Вода для ін'єкцій			20	Втрати (≈4%)			0,72
Всього	20,18			Всього	20,18		
ДР6. Підготовка поживного середовища							
Залізо лимоннокисле аміачне	1,28·10 ⁻⁷			Поживне середовище			2,189
Глікокол	1,28·10 ⁻⁵			Втрати (≈6%)			0,1412
Амоній лимоннокислий	8,1·10 ⁻⁶						
Калій фосфорнокислий двозаміщений	1,17·10 ⁻⁵						
Магній сірчанокислий семиводний	8,1·10 ⁻⁶						
Гліцерин	1,28·10 ⁻⁴						
Вода демінералізована			2,33				
Всього	2,3302			Всього	2,3302		

Продовження таблиці 4.3

ДР7. Підготовка поживного середовища для активації культури							
Картопляні клини		7		Картопляні клини, занурені у гліцеринову воду у пробірках		7	
Гліцеринова вода			0,009	Гліцеринової води у пробірках			0,007
Пробірки		7		Кількість пробірок із середовищем		7	
Пробки		7		Пробки, що закривають пробірки		7	
				Втрати гліцеринової води при розливі			0,002
Всього		21,009		Всього		21,009	
ДР8.1. Відновлення музейної культури							
Кількість пробірок із середовищем ДР7		7		Вирощений посівний матеріал	0,001		
Гліцеринової води у пробірках із середовищем від ДР7			0,007	Кількість використаних пробірок із середовищем		7	
Картопляні клини, занурені у гліцеринову воду у пробірках		7		Картопляних клінів, занурених у гліцеринову воду		7	
Ліофілізована біомаса БЦЖ	$3,5 \cdot 10^{-6}$			Гліцеринова вода у пробірках			0,0065
				Втрати			0,0005
Всього		14,008		Всього		14,008	

Продовження таблиці 4.3

ДР8.2.1. Отримання посівного матеріалу I генерації							
Середовища від ДР6			0,712	Біомаса мікобактерії I генерації	0,002		
Колби для середовища		7		Колб із середовищем і біомасою		7	
Пробки		7		Пробки		7	
Посівний матеріал від ДР8.1	0,001			Середовище у колбах			0,7
				Втрати середовища			0,011
Всього	14,713			Всього	14,713		
ДР8.2.2. Отримання посівного матеріалу II генерації							
Біомаса мікобактерії I генерації	0,002			Біомаса мікобактерії I генерації	0,003		
Колби для середовища		7		Колб із середовищем і біомасою		7	
Пробки		7		Пробки		7	
Середовище від ДР6			0,712	Середовище у колбах			0,7
				Втрати середовища			0,011
Всього	14,714			Всього	14,714		
ТП9. Виробниче культивування							
Поживне середовище			0,765	Культуральна рідина: - біомаса в КР - об'єм середовища	0,00567		0,66
Посівний матеріал	0,003			Колби		6	
Колби		7		Пробки		6	
Пробки		7		Втрати через некондиційний матеріал: - біомаса - об'єм середовища - колби - пробки	0,0021	1 1	0,1004
Всього	14,768			Всього	14,768		

Таблиця 4.4

Матеріальний баланс для технологічного процесу виробництва вакцини
БЦЖ. Частина 2.

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
	г	шт	л		г	Шт	л
ТП10.1. Фільтрація мікробної маси							
Культуральна рідина:				Біомаса клітин	5,5		
- біомаса в КР	5,67						
- об'єм середовища			0,66				
				Фільтрат середовища			0,64
				Втрати біомаси (≈3%)	0,17		
				Втрати фільтрату (≈3%)			0,02
Всього	6,33			Всього	6,33		
ТП10.5. Розведення стабілізатором							
Біомаса клітин	5,5			Первинна суспензія: - маса біомаси у суспензії - об'єм розчинника у суспензії	5,5		0,11
Глутамат натрію, 1,5%			0,11				
Всього	5,61			Всього	5,61		
ТП10.6. Центрифугування суспензії							
Первинна суспензія - маса біомаси БЦЖ - об'єм розчинника	5,5		0,11	Супернатант (50 мг/мл) - маса біомаси в розчині - об'єм розчинника	4,875		0,0975

Продовження таблиці 4.4

				Важка фаза: - маса біомаси в осаді - об'єм розчинника в осаді	0,575		0,0115
				Технологічні втрати (1%) суспензії: - маса біомаси БЦЖ в суспензії - втрати розчинника	0,05		0,001
Всього		5,61		Всього		5,61	
ТП10.7. Розведення стабілізатором							
Супернатант, 50 мг/мл: - маса біомаси БЦЖ - об'єм розчинника	4,875		0,0975	Вакцинний препарат, 0,5 мг/мл: - маса біомаси БЦЖ - об'єм розчинника	4,875		9,75
Глутамат натрію, 1,5%			9,6525				
Всього		14,625		Всього		14,625	
ТП11. Наповнення ампул							
Вакцинний препарат, 0,5 мг/мл: - маса біомаси у препараті - об'єм розчинника	4,875		9,75	Ампули із вакцинним препаратом, 0,5 мг/мл: - маса біомаси клітин БЦЖ в об'ємі розчину в ампулах - об'єм розчину в ампулах - кількість наповнених ампул	4,865		9,73
Кількість ампул ШП6-НС-3 для вакцинного препарату		9750					
Фізіологічний розчин, 0,9%			19,46			9730	

Продовження таблиці 4.4

Кількість ампул для фізіологічного розчину		9730		Ампули із фізіологічним розчином: - кількість наповнених ампул		9720	
				- об'єм розчину в ампулах			19,44
				Втрати при розливі препарату ($\approx 0,5\%$):			
				- втрати біомаси в об'ємі розчину	0,01		
				- втрати розчину з біомасою			0,02
				Втрати при розливі фізіологічного розчину (1%)			0,02
				Втрати по ампулам		30	
Всього		19514,085		Всього		19514,085	
ТП13. Ліофілізація вакцинного препарату							
Ампули із вакцинним препаратом: - біомаса клітин із вологістю 85% - маса води - об'єм стабілізатора - кількість ампул	4,865 26,89 9730		9,73	Ампули із ліофілізованим вакцинним препаратом: - маса культури із вологістю 2% - кількість ампул	4,86 9720		
				Маса води, видаленої при висушуванні	26,89		
				Конденсат			9,72

Продовження таблиці 4.4

				Технологічні втрати (≈0,1%):	0,005	10	0,01
				- вакцини			
				- ампул			
				- розчину			
Всього	9771,485			Всього	9771,485		
ПМВ18. Пакування, маркування, відвантаження							
Ліофілізований вакцинний препарат	4,86			Ліофілізований вакцинний препарат	4,85		
Ампули з ліофілізованим вакцинним препаратом		9720		Ампули з ліофілізованим вакцинним препаратом		9700	
Фізіологічний розчин, 0,9%			19,44	Фізіологічний розчин, 0,9%			19,4
Ампули із фізіологічним розчином		9720		Ампули із фізіологічним розчином		9700	
Етикетки з інформацією про вакцину		9720		Етикетки на ампулах з вакциною		9700	
Етикетки з інформацією про фізіологічним розчин		9720		Етикетки на ампулах з фізіологічним розчином		9700	
Контурні чарункові упаковки для ампул з вакциною		1944		Контурні чарункові упаковки з ампулами з вакциною		1940	
Контурні чарункові упаковки для ампул з фізіологічним розчином		1944		Контурні чарункові упаковки з ампулами з фізіологічним розчином		1940	
Вторинна упаковка		1944		Вторинна упаковка з чарунковими упаковками з ампулами з вакциною і фізіологічним розчином		1940	

Продовження таблиці 4.4

Інструкції з медичного застосування		1944		Інструкції, вкладені у вторинну упаковку		1940	
Скарифікатори		1944		Скарифікатори для ампул, вкладені у вторинну упаковку		1940	
Картонні коробки (групова тара)		98		Картонні коробки з вторинними упаковками з ампулами і пакуванням		97	
				Втрати при пакуванні, з них: - врати ліофілізованого препарату БЦЖ - врати за фізіологічним розчином - врати за етикетками - врати за ампулами - врати за контурними чарунковими упаковками - врати за вторинною упаковкою - врати за інструкціями - врати за скарифікаторами - врати за груповою тарою	0,01		0,04
						40	
						40	
						8	
						4	
						4	
						4	
						1	
Всього		48722,3		Всього		48722,3	

4.5. Контроль виробництва

Якість готового продукту та відповідність його наведеним вище вимогам залежить від контролю на виробництві. Контрольовані точки, а також необхідні параметри і межі їх змін наведені у таблиці.

Таблиця 4.5

Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
ДР1.1.2 Санітарні підготовка персоналу до роботи Кт 1.1.2.1 Км 1.1.2.2	Персонал	Візуально	Кожну операцію	Наявність спецодягу
	Мікробіологічна чистота робочого одягу	Висів	Раз на тиждень	Відсутність мікроорганізмів
ДР1.2.1 Приготування розчину миючого засобу Кт 1.2.1.1 Кх 1.2.1.2	Частота обертів мішалки	Тахометр	Кожного циклу	100 об/хв
	Час змішування	Годинник	Кожного циклу	10 хв
	Концентрація розчину	Точність дозування, рефрактометр	Кожну операцію	Від 5 до 7%
ДР1.2.2 Приготування розчину перекису водню Кт 1.2.2.1 Кх 1.2.2.1	Концентрація розчину	Точність дозування, рефрактометр	Кожну операцію	6%
ДР1.2.3 Приготування розчину етилового спирту Кт 1.2.3.1 Кх 1.2.3.1	Концентрація розчину	Точність дозування, рефрактометр	Кожну операцію	70%

Продовження таблиці 4.5

ДР1.3.1 Щоденне прибирання Кт 1.3.1.1 Км 1.3.1.2	Приміщення, робочі місця, обладнання, запиленість	Візуально	Кожного дня	Відсутність забруднень
ДР1.3.2 Генеральне прибирання Кт 1.3.2.1 Км 1.3.2.2	Приміщення, обладнання, запиленість	Візуально	Раз на тиждень	Відсутність забруднень
	Мікробіологічна чистота обладнання та приміщення	Мікробіологічн ий аналіз	Раз на тиждень	Залежно від класу чистоти приміщення
ДР1.4.1 Огляд одягу Кт 1.4.1.1	Технологічний одяг	Візуально	До початку прання	Одяг без пошкоджень
ДР1.4.2 Прання одягу Кт 1.4.2.1	Температура прання	Термоелектрич ний датчик	Кожну операцію	40-60°C
	Час прання	Годинник	Кожну операцію	30 хв
ДР1.4.3 Ополіскування одягу Кт 1.4.3.1	Випраний одяг	Візуально	Після циклу прання	Відсутність залишків миючого засобу
ДР1.4.4 Сушіння одягу Кт 1.4.4.1	Температура сушіння	Термоелектрич ний датчик	Кожну операцію	70°C
	Час сушіння	Годинник	Кожну цикл	30 хв
ДР1.4.5 Пакування одягу Кт 1.4.5.1	Цілісність пакувального паперу	Візуально	Після пакування одягу	Цілісність упаковки
ДР1.4.6 Стерилізація одягу Кт 1.4.6.1 Км 1.4.6.2	Тиск стерилізація	Дифманометр	Кожну операцію	0,1 МПа
	Температура стерилізація	Термоелектрич ний датчик	Кожну операцію	121°C
	Час стерилізація	Годинник	Кожну операцію	45 хв
	Мікробіологічни й контроль	Мікробіологічн ий аналіз	Кожну операцію	Мікробіологічна чистота

Продовження таблиці 4.5

ДР1.4.7 Зберігання стерильного одягу Кт 1.4.7.1	Температура зберігання	Термометр	Кожну операцію	10-30°C
	Вологість	Психрометр	Кожну операцію	50-70%
	Час зберігання	Календар		2 місяці
ДР1.5.2 Ополіскування обладнання Кт 1.5.2.1	Чистота обладнання	Візуально	Кожну операцію	Чисті поверхні без залишку миючого та дезінфікуючого засобу
ДР1.5.3 Стерилізація вузлів обладнання Кт 1.5.3.1 Км 1.5.3.2	Температура стерилізації	Термоелектрич ний датчик	Кожну операцію	105-125°C
	Час стерилізації	Годинник	Кожну операцію	5-10 хв
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічн ий аналіз	Кожну операцію	Відсутність мікробіологічного забруднення
ДР2.1.1 ДР2.2.1 Забір повітря Кт 2.1.1.1 Кт 2.2.1.1	Висота забору повітря	Вимірювальне приладдя	Одноразово	8-10 м
ДР2.1.2 ДР2.2.2 Попередня очистка повітря від механічних часток Кт 2.1.2.1 Кт 2.2.2.1	Діаметр пор фільтрувального матеріалу	Вимірювальне приладдя	Кожну операцію	5 мкм
	Механічні частинки	Гравіметричн ий метод	Кожну операцію	80%
ДР2.1.3 ДР2.2.3 Нагнітання повітря Кт 2.1.3.1 Кт 2.2.3.1	Тиск подачі повітря	Дифманометр	Кожну операцію	0,2 МПа

Продовження таблиці 4.5

ДР2.1.4 ДР2.2.4 Стабілізація показників повітря Кт 2.1.4.1 Кт 2.2.4.1	Тиск	Дифманометр	Кожну операцію	0,3 МПа
	Температура повітря	Термоелектричний датчик	Кожну операцію	25-40°C
ДР2.1.5 Очищення на фільтрах I ступеня Кт 2.1.5.1 Км 2.1.5.2	Перепад тиску	Дифманометр	Кожну операцію	До 0,01 МПа
	Механічні частинки	Гравіметричний методом	Кожні 24 години	<3,5 млн. частинок d=0,5 мкм та <20 тис. частинок d=5 мкм у 1 м ³
	Ступінь чистоти	Апарат Кротова	Кожні 24 години	200 м/о в 1 м ³
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний метод	Кожні 24 години	Допускається
ДР2.1.6 Очищення на фільтрах II ступеня Кт 2.1.6.1 Км 2.1.6.2	Перепад тиску	Дифманометр	Кожну операцію	До 0,01 МПа
	Механічні частинки	Гравіметричний методом	Кожні 24 години	<350 тис. частинок d=0,5 мкм та <3 тис. частинок d=5 мкм у 1 м ³
	Ступінь чистоти	Апарат Кротова	Кожні 24 години	Ефективність очистки 99,5%
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний метод	Кожні 24 години	Виключаються мікробіологічні контаміанти

Продовження таблиці 4.5

ДР2.1.7 Очищення на фільтрах III ступеня Кт 2.1.7.1 Км 2.1.7.2	Перепад тиску	Дифманометр	Кожну операцію	До 0,01 МПа
	Механічні частинки	Гравіметричний методом	Кожні 24 години	<3,5 тис. частинок d=0,5 мкм та <900 частинок d=1 мкм, <102 тис. частинок d=0,3 мкм у 1 м ³
	Ступінь чистоти	Апарат Кротова	Кожні 24 години	Ефективність очистки 99,995%
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний метод	Кожні 24 години	Виключається мікробіологічна контамінація
ДР2.2.5 Очищення повітря на загальному фільтрі Кт 2.2.5.1 Км 2.2.5.2	Вологість	Психрометр	Кожну операцію	60-90%
	Ступінь чистоти	Апарат кротова	Кожні 24 години	Ефективність очистки 99%
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний метод	Кожні 24 години	Мікробіологічна чистота
ДР2.2.6 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі Кт 2.2.6.1 Км 2.2.6.2	Вологість	Психрометр	Кожну операцію	60-90%
	Перепад тиску	Дифманометр	Кожну операцію	До 0,01 МПа
	Ступінь чистоти	Апарат кротова	Кожні 24 години	Ефективність очистки 99,9999%
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний метод	Кожні 24 години	Мікробіологічна чистота
ДР3.1 Попередня фільтрація води Кт 3.1.1 Кх 3.1.2	Перепад тиску	Дифманометр	Кожну операцію	До 0,1 МПа
	Якість води	Кількісний хімічний аналіз	Кожну операцію	Відсутність хімічних домішок
ДР3.2 Очистка води зворотнім осмосом Кт 3.2.1 Кх 3.2.2	Температура очистки	Термоелектричний датчик	Кожну операцію	20°C
	Рівень рН води	рН-метр	Кожну операцію	4,5-7,0
	Якість води	Кількісний хімічний аналіз	Кожну операцію	Відсутність мінеральних домішок

Продовження таблиці 4.5

ДР3.2.1 Зберігання води демінералізованої Кт 3.2.1.1 Км 3.2.1.2	Тривалість зберігання	Годинник	Після очистки	3 доби
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологіч ний метод	Протягом зберігання	Мікробіологічна чистота
ДР3.3.1 Очистка води дистиляцією Кт 3.3.1.1 Кх 3.3.1.2	Тиск	Дифманометр	Кожну операцію	0,6-0,81 МПа
	Температура	Термоелектрич ний датчик	Кожну операцію	100-160°C
	Якість води	Кількісний хімічний аналіз	Кожну операцію	Відсутність домішок
ДР3.3.2 Стерилізація води ін'єкційної Кт 3.3.2.1 Км 3.3.2.2	Тиск	Дифманометр	Кожну операцію	0,12-0,18 МПа
	Температура стерилізації	Манометрич ний термометр	Кожну операцію	120-130°C
	Час стерилізації	Годинник	Кожну операцію	20-30 хв
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологіч ний метод	Після завершення стерилізації	Мікробіологічна чистота
ДР3.3.3 Зберігання води ін'єкційної Кт 3.3.3.1 Км 3.3.3.2	Температура	Термоелектрич ний датчик	Кожну операцію	65-75°C
	Час зберігання	Годинник	Кожну операцію	24 години
	Мікробіологічна чистота	Попередження контамінації	Протягом зберігання	Відсутність контамінації
ДР4.4.1 Зовнішня мийка ампул Кт 4.4.1.1	Температура води	Манометрич ний термометр	Кожну операцію	60°C
ДР4.4.2 Внутрішня мийка ампул Кт 4.4.2.1	Тиск	Дифманометр	Кожну операцію	0,14 МПа
	Температура води	Манометрич ний термометр	Кожну операцію	80°C
	Час	Секундомір	Кожну операцію	10-15 с

Продовження таблиці 4.5

ДР4.2 Стерилізація ампул Кт 4.2.1 Км 4.2.2	Температура для первинного висушування	Манометричний термометр	Кожну операцію	170°C
	Температура стерилізації	Манометричний термометр	Кожну операцію	300°C
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний метод	Кожну операцію	Відсутність контамінації
ДР4.3 Контроль механічних включень Кт 4.3.1	Наявність механічних часток (пилу і т.д.)	Візуально	Кожну операцію	Відсутність забруднень
ДР5.1 Приготування розчину для ін'єкцій Кт 5.1.1	Частота обертів мішалки	Тахометр	Кожну операцію	0,2-1,3 об/хв
	Концентрація розчину	Точність дозування, ваги, рефрактометр	Кожну операцію	0,9%
ДР5.2 Фільтрація розчину Кт 5.2.1 Км 5.2.2	Порядок фільтрувальних матеріалів із різним діаметром пор	Візуально	Кожну операцію	d ₁ =5 мкм d ₂ = 0,65 мкм d ₃ = 0,2 мкм
	Перепад тиску	Дифманометр	Кожну операцію	До 0,01 МПа
	Наявність механічних часток	Фотоелектроколориметр	Протягом операції	Відсутність механічних часток
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний метод	По завершенню фільтрування	Відсутність контамінації
ДР5.3 Зберігання розчину для ін'єкцій Кт 5.3.1 Км 5.3.2	Температура зберігання	Манометричний термометр	Кожну операцію	20-25°C
	Час	Календар	Кожну операцію	3 місяці
	Мікробіологічна частота	Мікробіологічний метод	Протягом зберігання	Відсутність контамінації

Продовження таблиці 4.5

ДР6.1 Розчинення компонентів середовища Кт 6.1.1	Температура розчинення	Манометрични й термометр	Кожну операцію	40-45°C
	Однорідність	Відбір проб, візуально	Протягом операції	Однорідність середовища
ДР6.2 Охолодження розчину Кт 6.2.1	Температура	Манометрични й термометр	Кожну операцію	20°C
ДР6.3 Стабілізація кислотності середовища Кт 6.3.1 Кх 6.3.2	pH середовища	pH-метр	Кожну операцію	6,5
	Об'єм стабілізатора pH	Точність дозування	Кожну подачу	
ДР6.4 Фільтрування середовища Кт 6.4.1	Тиск	Дифманометр	Кожну операцію	0,1 МПа
	Контроль механічних включень	Відбір проб, візуально	Після фільтрування	Відсутність механічних включень
ДР6.5 Стерилізація середовища Кт 6.5.1 Км 6.5.2	Температура стерилізації	Манометрични й термометр	Кожну операцію	120°C
	Час	Годинник	Кожну операцію	20 хв
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічн ий методі	За 24 години до подачі у виробництво	Відсутність контамінації
ДР7 Підготовка середовища для активації культури Кт 7.1	Чистота картоплин, розмір картопляних клинів, глибина занурення клинів у гліцеринову воду	Візуально	Кожну операцію	
	Температура стерилізації	Манометрични й термометр	Кожну операцію	110°C
	Час стерилізації	Годинник	Кожну операцію	10 хв

Продовження таблиці 4.5

ДР8 Підготовка посівного матеріалу Кт 8.1 Км 8.2	Температура	Манометричний термометр	Кожну операцію	38°C
	Час	Календар	Кожну операцію	Для відновлення музейної культури – 24 доби; для отримання посівного матеріалу I та II генерацій – 7 діб
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічні методи, візуально	Протягом операцій	Відсутність мікробної контамінації, чиста культура мікобактерій; візуально – сухі, зморшкуваті плівки на середовищі кольору слонової кістки
ТП9 Виробниче культивування Кт 9.1 Км 9.2 Кх 9.3	Температура культивування	Манометричний термометр	Кожну операцію	38°C
	pH	pH-метр	До моменту засіву середовища	6,5
	Час	Календар	Кожну операцію	11 діб
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічні методи, візуально	Протягом та після культивування	Відсутність мікробної контамінації, чиста культура мікобактерій; візуально – сухі, зморшкуваті плівки на середовищі кольору слонової кістки
ТП10.1 Фільтрація мікробної маси Кт 10.1.1 Км 10.1.2	Перепад тиску	Дифманометр	Кожну операцію	До 0,01 МПа

Продовження таблиці 4.5

ТП10.3 Охолодження біомаси Кт 10.3.1	Температура	Манометричний термометр	Кожну операцію	4°C
	Час	Годинник	Кожну операцію	30 хв
ТП10.4 Розтирання мікробної біомаси Кт 10.4.1	Температура	Термометр	Кожну операцію	10-18°C
	Час	Годинник	Кожну операцію	30 хв
	Частота роботи шутль-апарату	Тахометр	Кожну операцію	75 об/хв
ТП10.5 Розведення стабілізатором Кт 10.5.1	Об'єм стабілізатора	Точність дозування, візуально	Кожну операцію	
	Концентрація біомаси	Фотоелектроко лориметр	Кожну операцію	50 мг/мл
ТП10.6 Центрифугування Кт 10.6.1	Частота обертів центрифуги	Тахометр	Кожну операцію	2000 об/хв
	Час	Годинник	Кожну операцію	15-20 хв
ТП10.7 Розведення стабілізатором Кт 10.7.1	Об'єм стабілізатора	Точність дозування, візуально	Кожну операцію	
	Концентрація біомаси	Фотоелектроко лориметр	Кожну операцію	0,5 мг/мл
ТП11 Наповнення ампул Кт 11.1 Км 11.2	Об'єми вакцинного препарату чи фізіологічного розчину	Точність дозування	Кожну операцію	0,2 мл для вакцинного препарату, 1 мл для розчинника
	Витік біомаси	Візуально	Кожну операцію	
ТП12 Заморожування препарату Кт 12.1	Температура	Манометричний термометр	Кожну операцію	-60°C
	Час	Годинник	Кожну операцію	1 година

Продовження таблиці 4.5

ТП13 Ліофілізація препарату Кт 13.1	Температура	Манометричний термометр	Кожну операцію	Для первинного висушування температура піднімається від -60°C до 0°C; для вторинного висушування 25°C
	Час	Годинник	Кожну операцію	Первинне висушування триває 20 годин, вторинне висушування 2 години
	Тиск	Дифманометр	Кожну операцію	10 Па
ТП14 Запаювання ампул Кт 14.1 Км 14.2 Кх 14.3	Тиск	Дифманометр	Операція запаювання ампул із вакциною	12 Па
	Контроль потоку азоту	Візуально	Операція запаювання ампул фізіологічним розчином	
	Витік біомаси	Візуально	Кожну операцію	Відсутність витіку
ТП15 Стерилізація ампул Кт 15.1	Тиск	Дифманометр	Кожну операцію	0,12 МПа
	Температура	Манометричний термометр	Кожну операцію	120°C
	Час	Годинник	Кожну операцію	20 хв
ТП16 Перевірка герметичності ампул Кт 16.1 Кх 16.2	Тиск	Дифманометр	Кожну операцію	120 кПа
	Час	Годинник	Кожну операцію	20-25 хв
	Огляд ампул	Візуально	Кожну операцію	Цілісність ампул
ТП17 Контроль та стандартизація Кт 17.1 Км 17.2 Кх 17.3	Мікробіологічна чистота, апірогенність, імуногенність і т.д відповідно до фармакопейних статей	Методи відповідно до фармакопейних статей	Кожну операцію	Відповідно до даних фармакопейних статей

Продовження таблиці 4.5

ПМВ18 Пакування, маркування, відвантаження Кт 18.1	Розміщення етикеток та інформація на них, кількість у чарункових упаковка, кількість чарункових упаковок у вторинній упаковці, пакування у групову тару	Автоматично, візуальний контроль апаратів	Кожну операцію	Одна етикетка з інформацією на ампулах з вакциною та фізіологічним розчином; по 5 ампул з вакциною чи фізіологічним розчином до 1 чарункової упаковки; по 1 чарунковій упаковці з ампулами з вакциною та з ампулами з фізіологічним розчином у вторинній упаковці; по 100 упаковок з препаратом у груповій тарі
ЗВ19 Знешкодження відходів Кт 19.1 Км 19.2 Кх 19.3	Концентрація відходів, відсутність патогенності	Кількісний хімічний та мікробіологічн ий аналіз	Кожну операцію	
ПВ20 Переробка відходів Кт 20.1 Км 20.2 Кх 20.3	Концентрація механічних часток, мікробіологічн ий аналіз	Кількісний хімічний аналіз, Мікробіологічн і методи	Кожну операцію	Відсутність механічних часток, мікробіологічних контамінантів

4.6. Технологічна схема виробництва

Технологічна схема для виробництва вакцини БЦЖ за вказаним вище описом наведена у графічному вигляді на аркуші формату А1.

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Етап відділення біомаси культури мікобактерій БЦЖ від середовища полягає у використанні процесу фільтрування. Він базується на відділенні твердої дисперсної фази у неоднорідній системі шляхом затримки її частинок на пористих перегородках – фільтрувальному матеріалі. Даний процес проходить внаслідок створення різниці тисків у середовищах, розділених фільтрувальною перегородкою. При розділенні таких неоднорідних систем виникає потреба у підборі конструкції фільтру, власне фільтрувального матеріалу із відповідним діаметром пор та режиму фільтрування.

Класифікацію фільтрів здійснюють за:

А) способом протікання процесу фільтрації:

- з накопичення осаду на поверхні фільтрувальної перегородки;
- або зі закупорюванням пор при проникненні частинок у пори фільтрувального матеріального (поєднується із накопиченням осаду на поверхні).

Б) типом рушійної сили:

- фільтрування за умови підвищеного тиску (закриті нутч-фільтри, фільтр-преси);
- за умови розрідження або вакуумне фільтрування (відриті нутч-фільтри, барабанні вакуум-фільтри).

В) періодичність процесу:

- фільтри періодичної дії (нутч-фільтр, фільтр-прес, патронний фільтр);

					ДП 6207. 00.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Разроб.		Левкобська А.В.			РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ		Літ.	Арк.
Перевір.		Фесенко С.В.						Аркушів
Керівн.		Орядінська Л.Б.					118	150
Затверд.							КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	

- фільтри безперервної дії (барабанні, карусельні, динамічні або дискові фільтри) [97].

Коли метою фільтрування ставлять отримання осаду, а не фільтрату, найчастіше застосовують або друк-фільтри, або барабанні вакуум-фільтри, які забезпечуватимуть отримання осаду на поверхні фільтрувальної перегородки. Обидві конструкції забезпечують розділення тонкодисперсних суспензій, що є важливим при фільтруванні культуральної рідини із невеликим вмістом культури бактерій. Подальший вибір базується на об'ємах технологічного процесу та періодичності етапу фільтрування [98].

Оскільки процес отримання цільового продукту – біомаси мікобактерій – є довготривалим, близько 11 діб, то варто обирати фільтр періодичної дії, тобто друк-фільтр. Фільтр такої конструкції не є громіздким, а отже буде доречним для фільтрування невеликого об'єму рідини, як у даному випадку. За для асептичності процесу фільтрування варто обирати саме закритий тип даної конструкції, який буде працювати при надлишковому тиску (0,3 МПа) для розділення суспензії з низьким вихідним вмістом твердої фази. Вивантаження осаду біомаси тут здійснюється вручну, але за додатковою допомогою опускного механізму, по завершенню процесу фільтрування при попередній промивці осаду, при цьому зупиняють подачу суспензії у фільтр. За великих об'ємів такий спосіб вивантаження осаду не є рентабельним, так як можливий високий процент втрат, проте при невеликих об'ємах не є доцільним використання складних конструкцій з автоматизованим вивантаженням осаду, як у даному випадку.

До того ж варто зазначити, що промивання, у даному випадку, отриманих мікобактерій у фільтрі здійснюють з використанням середовища висушування – 1,5% розчину глютамату натрію. Для кращого проходження процесу відділення осаду біомаси від фільтрувального матеріалу, друк-

фільтр оснащений перемішуючим пристроєм, який дозволяє додатково звільнити пори мембрани, у разі потрапляння туди мікобактерій.

Фільтрувальні матеріали можуть бути різні, залежно від матеріалу та способу виготовлення, як текстильні (шерстяні, синтетичні, бавовняно-паперові), сітчасті (металічні, полімерні), керамічні й т.д. У якості фільтрувального матеріалу рекомендується використання трекових мембран із діаметром пор 0,2 мкм. Ця фільтрувальна перегородка виготовлена на основі полімерної плівки з лавсану (або поліетилентерефталат), який характеризується своєю біосумісністю і є нейтральним стосовно бактерій. Процес, завдяки якому отримують даний матеріал – опромінення іонами аргону із подальшою сенсibilізацією та хімічною обробкою, забезпечує точне формування пор із необхідним діаметром. Такий фільтрувальний матеріал забезпечуватимуть високий показник виходу проміжного продукту – осаду біомаси мікобактерій – і мінімальне потрапляння клітин культури у фільтрат, що значно знижуватиме витрати на даному етапі. Діаметр пор було підібрано саме для клітин мікобактерій бичачого туберкульозу, які є найменшими серед інших представників мікобактерій туберкульозного комплексу [94, 98].

Серед недоліків використання друк-фільтрів можна виділити довготривалість процесу фільтрування та низьку продуктивність, але в умовах невеликих об'ємів фільтрування цим недоліком можна знехтувати. Також варто зазначити про неможливість повної регенерації фільтрувального матеріалу, а в умовах патогенності мікобактерій його можна вважати одноразовим. У сучасних виробництвах, при роботі з патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами використовують сучасні капсульні фільтри, що забезпечують фільтрацію невеликих об'ємів, легко піддаються автоклавуванню або можуть використовуватись одноразово, проте в Україні їх розробка не є широко розповсюдженою. Саме тому, враховуючи все

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		120

написане вище, варто зупинитись на конструюванні друк-фільтрів закритого типу, що буде оптимальним [97, 99].

Технічна характеристика обраного апарату:

1. Об'єм апарату	0,002 м ³
2. Площа фільтрувальної перегородки	0,012 м ²
3. Матеріал фільтрувальної перегородки	Трекова мембрана (лавсан або поліетилентерефталат)
4. Робочий тиск	0,3 МПа
5. Матеріал апарату	Сталь 12Х18Р10Т ГОСТ 7350-77
6. Тип перемішуючого пристрою	Лопатева мішалка
- кількість мішалок	1
- частота обертання мішалки	0,21 с ⁻¹
- потужність приводу, Вт	0,13 Вт
6. Габаритні розміри:	
- висота	0,370 м
- довжина	0,154 м
- внутрішній діаметр	0,125 м
- ширина	0,154 м

5.2. Технологічний, конструктивний, тепловий розрахунки

5.2.1. Матеріальний баланс процесу фільтрування

Матеріальний баланс складається для визначення продуктивності фільтру за осадам. Рівняння матеріального балансу для всієї системи [97]:

$$G_c = G_{oc} + G_{\phi} = 0,0055 + 0,6545 = 0,66 \quad (5.1)$$

Рівняння матеріального балансу для твердої фази:

$$G_c x_c = G_{oc} x_{oc}, \quad (5.2)$$

де G_c , G_{oc} , G_ϕ – продуктивність відповідно за вихідною суспензією, осадом та фільтратом, кг/с;

x_c , x_{oc} – масова частка твердої фази відповідно в суспензії та осаді, долі одиниці.

Сумісним вирішенням рівнянь визначають кількість вологого осаду і фільтрату:

Кількість твердої речовини, що міститься у суспензії:

$$G_T = G_c \cdot x_c = 0,66 \cdot 0,0086 = 0,00567 \text{ кг/с} \quad (5.3)$$

Кількість рідкої фази у суспензії:

$$G_{жс} = G_c - G_T = 0,66 - 0,00574 = 0,654 \text{ кг/с} \quad (5.4)$$

Кількість осаду:

$$G_{oc} = \frac{G_c \cdot x_c}{x_{oc}} = \frac{0,66 \cdot 0,0087}{0,9} = 0,0055 \text{ кг/с} \quad (5.5)$$

Кількість твердої фази в осаді:

$$G_T = G_{oc} \cdot x_{oc} = 0,0055 \cdot 0,9 = 0,00495 \text{ кг/с} \quad (5.6)$$

Кількість рідкої фази в осаді:

$$G_{жс} = G_{oc} - G_T = 0,0055 - 0,00495 = 0,00055 \text{ кг/с} \quad (5.7)$$

Кількість фільтрату:

$$G_\phi = G_c - G_{oc} = 0,66 - 0,0055 = 0,6545 \text{ кг/с} \quad (5.8)$$

Враховуючи об'єм культуральної рідини, що подається на фільтрування, необхідно підбирати конструкцію фільтру, що буде із втричі більшим об'ємом заповнення:

$$V_{\text{фільтру}} = 3 \cdot G_c = 3 \cdot 0,66 = 1,98 \text{ л} = 0,00198 \text{ м}^3 \quad (5.9)$$

Для вибору закритого друк-фільтру скористаємось каталогом для лабораторних друк-фільтрів. Серед запропонованих найближчим за об'ємом є фільтр з об'ємом 2 л із площею фільтрувальної поверхні 0,012 м² [100].

5.2.2. Технологічний розрахунок

Об'ємна продуктивність фільтру по фільтрату [97]:

$$V_{\phi} = \frac{G_{\phi}}{\rho_{\phi}} = \frac{0,6536}{1000,05} = 0,0006 \text{ м}^3 / \text{с}, \quad (5.10)$$

припускаючи, що густина фільтрату ρ_{ϕ} буде дорівнювати густині поживного середовища ρ_{nc} , як реактивної маси, що визначається як:

$$\rho_{nc} = \frac{w_1}{\rho_1} + \frac{w_2}{\rho_2} + \frac{w_3}{\rho_3} + \frac{w_4}{\rho_4} + \frac{w_5}{\rho_5} + \frac{w_6}{\rho_6} + \frac{w_7}{\rho_7} = \frac{5,49 \cdot 10^{-8}}{1} + \frac{5,49 \cdot 10^{-6}}{1,607} + \frac{3,48 \cdot 10^{-6}}{1} + \frac{5,02 \cdot 10^{-6}}{2,33} + \frac{3,47 \cdot 10^{-6}}{2,66} + \frac{5,49 \cdot 10^{-5}}{1,26} + \frac{1}{1} = 1,00005 \text{ г/см}^3 = 1000,05 \text{ кг/м}^3 \quad (5.11)$$

де $w_1, w_2, w_3, w_4, w_5, w_6, w_7$ – масові частки компонентів поживного середовища: заліза лимоннокислого аміачного, глікоколу, амонію лимоннокислого, калію фосфорнокислого двозаміщеного, магнію сірчанокислого, гліцерину та води демінералізованої відповідно, у мас. частках; $\rho_1, \rho_2, \rho_3, \rho_4, \rho_5, \rho_6, \rho_7$ – густини компонентів поживного середовища: заліза лимоннокислого аміачного, глікоколу, амонію лимоннокислого, калію фосфорнокислого двозаміщеного, магнію сірчанокислого, гліцерину та води демінералізованої відповідно, у г/см³.

Об'ємна продуктивність фільтру по осаду:

$$V_{oc} = \frac{G_{oc}}{\rho_{oc}} = \frac{0,0064}{446,43} = 1,48 \cdot 10^{-5} \text{ м}^3 / \text{с}, \quad (5.12)$$

де ρ_{oc} – густина вологого осаду, який можна визначити через формулу для висококонцентрованої суспензії:

$$\rho_{сусп} = \frac{n+1}{\frac{1}{\rho_m} + \frac{n}{\rho_{ж}}} = \frac{\rho_{ж}\rho_m(n+1)}{\rho_{ж} + n\rho_m} = \frac{1000,05 \cdot 8 \cdot (100+1)}{1000,05 + 100 \cdot 8} = 446,43 \text{ кг/м}^3, \quad (5.13)$$

в якій де n – кількість маси рідкої фази на одиницю твердої фази (Т:Ж=1: n , $n=0,66/0,0066=100$);

$\rho_{ж}$ і ρ_m – густина рідкої та твердої фази відповідно, кг/м³.

Співвідношення об'ємів осаду та фільтру:

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		123

$$u = \frac{V_{oc}}{V_{\phi}} = \frac{1,48 \cdot 10^{-5}}{0,0006} = 0,025 \quad (5.14)$$

Питомий опір осаду [101]:

$$r_0 = 0,69 \cdot 10 \cdot \Delta p^{0,33} = 0,69 \cdot 10 \cdot (0,3 \cdot 10^6)^{0,33} = 387,42 \quad (5.15)$$

Константа фільтрування, що враховує режим процесу і фізико-хімічні властивості осаду і рідини

$$K = \frac{2\Delta p}{\mu_{\phi} \cdot r_0 \cdot u} = \frac{2 \cdot 0,3 \cdot 10^6}{1,054 \cdot 10^{-6} \cdot 387,42 \cdot 0,026} = \frac{6 \cdot 10^5}{10,6 \cdot 10^{-6}} = 5,66 \cdot 10^{10} \text{ м}^2 / \text{с}, \quad (5.16)$$

де Δp - перепади тиску на фільтрувальній перегородці;

μ_{ϕ} –динамічний коефіцієнт в'язкості фільтрату, Па·с.

Середня швидкість фільтрування за цикл обробки суспензії, м/с:

$$w_{\phi} = \frac{V_{\phi}}{F_{\phi}} = \frac{0,0006}{0,012} = 0,05 \text{ м / с} \quad (5.17)$$

Висоту шару осаду можна виразити через об'єм отриманого осаду:

$$h_{oc} = \frac{V_{oc}}{F_{\phi}} = \frac{1,48 \cdot 10^{-5}}{0,012} = 0,0012 \text{ м} \quad (5.18)$$

5.2.3. Конструктивний розрахунок

Розрахунок розмірів апарату

Опираючись на внутрішній діаметр фільтру $D = 0,125$ м, враховуючи, що об'єм циліндричної ємності фільтру 2 л ($V=0,002 \text{ м}^3$) розрахуємо висоту циліндричної частини апарата:

$$H_{\phi.a.} = \frac{V}{\pi \cdot \left(\frac{D}{2}\right)^2} = \frac{0,002}{\pi \cdot \frac{0,125^2}{4}} = 0,163 \text{ м} \quad (5.19)$$

Дана висота є приблизною, для конструкції краще обрати $H_{\phi.a.} = 0,165$ мм.

Приблизне співвідношення розмірів порожнин фільтрувального апарату, розділених фільтрувальною перегородкою $H_1:H_2=2,5:1$, тому:

$$H_1 = \frac{H_{\phi.a.}}{3,2} \cdot 2,2 = 0,115 \text{ м} \quad (5.20)$$

$$H_2 = \frac{H_{\phi.a.}}{3,2} = 0,05 \text{ м} \quad (5.21)$$

Висоти указані без врахування днища та кришки. Розміщення фільтрувального матеріалу буде на глибині H_1 .

Розрахунок товщини обичайки

Обираємо матеріал обичайки – сталь марки Ст3сп. Для цієї сталі $\sigma_g=140 \text{ МН/м}^2$, при $t = 20^\circ\text{C}$ Надлишковий тиск у колоні - 0,1 МПа; внутрішній діаметр обичайки – 0,5 м; запас на корозію – 0,001 м; при використанні двустороннього стикового звареного шва $\phi=0,95$.

Товщина обечайки розраховуємо за формулою:

$$s_{\text{обич}} = \frac{D \cdot P}{2\sigma_g \cdot \phi} + C_K = \frac{0,125 \cdot 0,3 \cdot 10^6}{2 \cdot 140 \cdot 10^6 \cdot 0,95} + 0,001 = 0,0011 \text{ м}, \quad (5.22)$$

де D - внутрішній діаметр, м;

P - надлишковий внутрішній тиск, Па;

σ_g - напруга, що допускається на розтягання для матеріалу обичайки, Н/м^2 ;

C_K - запас на корозію, м.

З конструктивних міркувань, дотримуючись рекомендації для даного діаметру приймаємо $s = 0,004 \text{ м}$.

Вибір днища та кришки апарату

Товщина днища розраховується аналогічно товщині обичайки та дорівнюватиме $s = 0,004 \text{ мм}$ (Рис. 5.1). Користуючись даними ГОСТ 6533-78, приймаємо:

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		125

- висота еліптичної частини днища $h_n = 0,015$ м;
- висота нееліптичної частини днища $h_l = 0,017$ м;
- діаметр днища, що відповідає діаметру апарату $D_n = D = 0,125$ м.

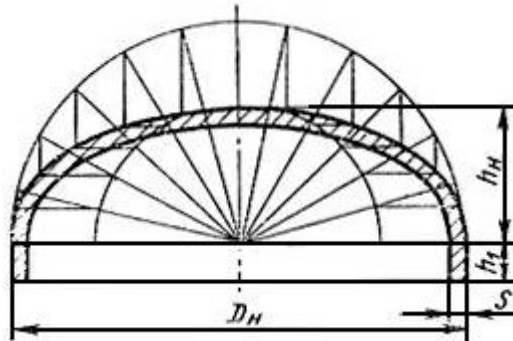


Рисунок 5.1. Конструкція днища/кришки апарату [102]

Відповідно, параметри еліптичної кришки друк-фільтру, що працює під надлишковим тиском, будуть відповідати параметрам днища.

Розрахунок перемішуючого пристрою

Враховуючи, що об'єм апарату $0,002$ м³, а місце розміщення мішалки – над фільтрувальним матеріалом, розрахуємо об'єм відведений на цю частину апарату:

$$V_1 = \pi \cdot \left(\frac{D}{2}\right)^2 \cdot H_1 = \pi \cdot \frac{0,125^2}{4} \cdot 0,115 = 0,0014 \text{ м}^3 \quad (5.23)$$

Для процесу фільтрації, особливо у друк-фільтрах малого об'єму, найкраще застосовувати лопатеву мішалку, з розміщеними під кутом лопатями.

Стандартні параметри лопатевої мішалки [103]:

$$\frac{D}{d_m} = 1,0 \div 1,7 \quad (5.24)$$

де d_m – діаметр мішалки.

$$\frac{h_m}{d_m} = 0,1 \quad (5.25)$$

де h_m – висота лопаті мішалки.

$$\frac{h}{d_m} = 0,4 \div 1,0 \quad (5.26)$$

де h – ширина однієї мішалки.

$$\frac{b}{d_m} = 0,1 \quad (5.27)$$

де b – відстань між внутрішньою стінкою та краєм мішалки; $\zeta_m = 0,86$, де ζ_m - критерій опору.

Нехай співвідношення $\frac{D}{d_m} = 1,04$, що дозволить захопити більшу площу поверхні фільтру, тоді діаметр лопатевої мішалки:

$$d_m = \frac{0,125}{1,04} \approx 0,12 \text{ м} \quad (5.28)$$

Наступні параметри:

$$h_m = 0,12 \cdot 0,1 = 0,012 \text{ м}$$

$$h = 0,12 \cdot 0,4 = 0,048 \text{ м}$$

$$b = 0,12 \cdot 0,1 = 0,012 \text{ м}$$

Відповідно до цього та типових діаметрів лопатевих мішалок, остаточно приймаємо $d_m = 120$ мм. Стандартна частота обертання при цьому:

$$n \geq C_{cn} \left(\frac{D \cdot d_u \cdot \Delta \rho}{d_m^4 \rho_p} \right)^2 \quad (5.29)$$

Приймаємо частоту обертів, як $n = 0,21 \text{ с}^{-1}$. Кількість мішалок, що припадає на один вал – $z_M = 1$.

Визначення глибини воронки

Припустимо, що рівень висоти рідини об'ємом $0,66 \cdot 10^{-3} \text{ м}^3$ в апараті становить $H_p = 0,054 \text{ м}$.

Параметр висоти завантаження апарата наступний [103]:

$$\gamma = 8 \cdot \frac{H_p}{D} + 1 = 8 \cdot \frac{0,054}{0,125} + 1 = 4,456 \quad (5.30)$$

Параметр гідравлічного опору мішалки знаходять за формулою:

$$E = \frac{\gamma}{\zeta_M \cdot z_M \cdot \text{Re}^{0,25}} = \frac{4,456}{0,86 \cdot 1 \cdot 224} = 0,023 \quad (5.31)$$

Відповідно до графіків параметру розподілу швидкості $\psi = f(E)$, враховуючи значення $E = 0,023$, значення $\psi = -0$, тоді $B = 9$.

Глибина воронки без відбиваючих перегородок становитиме:

$$h_g = \frac{B \cdot n^2 \cdot d_m}{2} = 0,024 \text{ м} \quad (5.32)$$

Гранично допустима глибина воронки дорівнює:

$$h_{gp} = H_p - h = 0,054 - 0,032 = 0,022 \text{ м} \quad (5.33)$$

Оскільки, гранично допустима глибина воронки не відрізняється сильно від встановленої, встановлення відображаючих перегородок в апараті не потрібне.

Розрахунок потужності

Розрахуємо діаметр валу мішалки для вибору торцьового ущільнення [103]:

$$d_g = c \cdot d_m = 0,166 \cdot 0,12 = 0,019 \text{ м} \quad (5.34)$$

Прийmemo діаметр валу мішалки як $d_{m\phi} = 0,02 \text{ м}$. Прийmemo сальникове ущільнення, тоді потужність, що буде витратись на тертя:

$$N_{\text{уц}} = 4 \cdot d_g^2 \cdot n \cdot \delta_H \cdot p \cdot \exp\left(0,2 \cdot \frac{h_H}{\delta_H} - 1\right) \cdot f_{\text{мп}} =$$

$$= 4 \cdot 0,02^2 \cdot 0,21 \cdot 0,006 \cdot 0,3 \cdot 10^6 \cdot \exp\left(0,2 \cdot \frac{0,026}{0,006} - 1\right) \cdot 0,083 \approx 0,13 \text{ Вт}$$
(5.35)

де $\delta_H = (4 \div 5) \cdot 10^{-2} \cdot d_g^{0,5} = 0,006 \text{ м}$ – товщина сальникової набивки, м;

$h_H = (4 \div 10) \delta_H = 0,026 \text{ м}$ – висота сальникової набивки, м;

$f_{\text{мп}} = (0,08 \div 0,12) = 0,083$ – коефіцієнт тертя;

p – надлишковий тиск в апараті, Па;

n – частота обертання мішалки, с^{-1} .

Розрахунок фланцевих з'єднань

Для діаметру $D = 0,125 \text{ м}$, відповідно до ГОСТ 12820-80 здійснюємо підбір сталевих плоских приварних фланцевих з'єднань із гладкою поверхнею (сполучним вступом) з болтами М5 (Рис. 5.2):

- $D_o = 0,145 \text{ м}$;
- $D_l = 0,137 \text{ м}$;
- $h = 0,005 \text{ мм}$;
- $d = 0,005 \text{ мм}$;
- число отворів $n = 8$.

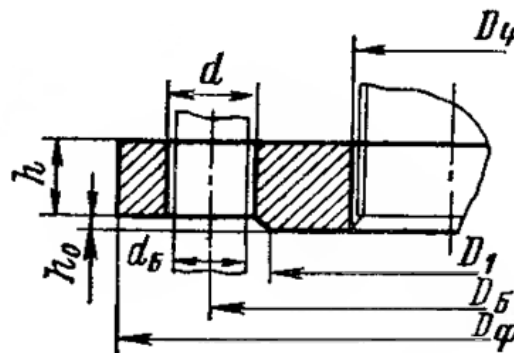


Рисунок 5.2. Конструкція фланців [104]

Розрахункове навантаження, що діє від внутрішнього надлишкового тиску:

$$Q_0 = 0,789 \cdot D_{\text{ср.п.}}^2 \cdot P_{\text{в.п.}} \quad (5.36)$$

де $D_{\text{ср.п.}}$ - середній діаметр прокладки, дорівнює:

$$D_{\text{ср.п.}} = \frac{D + D_1}{2} = \frac{0,125 + 0,137}{2} = 0,131 \text{ м} \quad (5.37)$$

$P_{\text{в.п.}} = 0,3 \text{ МПа}$ – внутрішній надлишковий тиск.

$$Q_0 = 0,789 \cdot 0,131^2 \cdot 0,3 \cdot 10^6 = 4,062 \cdot 10^3 \text{ Н} \quad (5.38)$$

Площа поперечного переріза болта по внутрішньому діаметрі різьблення, рівна:

$$f_{\bar{\sigma}} = 0,95 \cdot d^2 = 0,95 \cdot 0,005^2 = 2,375 \cdot 10^{-5} \text{ м}^2 \quad (5.39)$$

Розрахункове осьове зусилля для болтів приймемо за зусилля, що діє на болт при попередньому обтисненні прокладок:

$$P_{\sigma_1} = \pi \cdot D_{\text{ср.п.}} \cdot b_0 \cdot q = 3,14 \cdot 0,131 \cdot 0,003 \cdot 10 \cdot 10^6 = 12,34 \cdot 10^3 \text{ Н} \quad (5.40)$$

де b_0 – ефективна ширина прокладки:

$$b_0 = b \text{ при } b \leq 0,015 \text{ м},$$

$$b_0 = 0,12 \cdot b^{\frac{1}{2}} \text{ при } b > 0,015 \text{ м},$$

тут b – ширина прокладки:

$$b = \frac{D_1 - D}{2} = \frac{0,131 - 0,125}{2} = 0,003 \text{ м}, \text{ тоді } b_0 = 0,003 \text{ м}$$

$q = 10 \text{ МПа}$ – питоме навантаження на прокладку (фторпласт).

Розрахунок штуцерів

Для подачі стисненого повітря всередину апарату та власне культуральної рідини, використовуватимемо ніпелі напівсферичні приварні для з'єднань трубопроводів по внутрішньому конусу відповідно до ГОСТ

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		130

16042-70, до яких буде під'єднано трубопроводи для введення (Рис. 5.3).

Параметри, встановлених на кришці апарату ніпелів наступні:

- $D = 0,0115$ м;
- $d = 0,004$ м;
- $D_4 = 0,0065$ м.

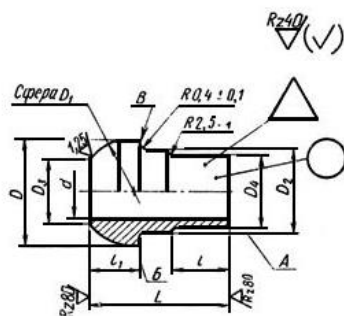


Рисунок 5.3. Конструкція ніпеля сферичного приварного [105]

Для відведення фільтрату після проведення процесу очищення, використовуватиме штуцер з фланцями сталевими плоскими приварними при тиску 0,3 МПа, відповідно до типу 1, виконання 1 (Рис. 5.4)

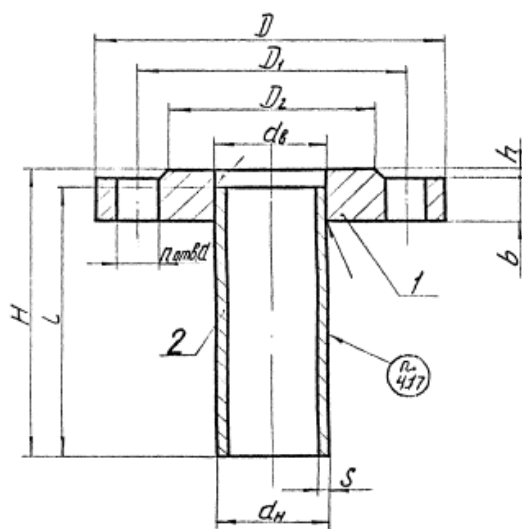


Рисунок 5.4. Конструкція штуцера [106]

Приймаємо відповідно наступні параметри за АТК 24.218.06-90 [106] :

- $D_1 = 0,019$ м;

- $D = 0,023$ м;
- $H_{ш} = 0,015$ м;
- $b = 0,003$ м.

Розмірами кришки не передбачено встановлення люку, що є стандартним для конструкцій друк-фільтрів об'ємом від 1 м³.

Загальна висота конструкції, враховуючи розміри привода та опор (за АТК 24.200.03-90) становитиме:

$$H = H_{заг} + H_{оп} + H_n + 2 \cdot h_1 + 2 \cdot h_n = 0,165 + 0,054 + 0,087 + 2 \cdot 0,015 + 2 \cdot 0,017 = 0,37 \text{ м} \quad (5.41)$$

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

Будь-яке виробництво базується на використанні додаткових допоміжних операцій. Ефективність виробництва нерідко залежить від вибору допоміжного обладнання та устаткування.

Оскільки, отримання культуральної рідини із необхідною біомасою здійснюється у виробничих колбах місткістю 0,5 л (у кількості 7 штук для одного серійного виробництва), при попередній передачі її до першого етапу очистки – фільтрування – необхідно злити увесь матеріал до єдиного резервуару. Оскільки об'єм невеликий (до 0,7 л), варто зосередити увагу на додатковому використанні виробничих колб місткістю 1,0 л. У цьому є потреба, адже зливати вміст кожної колби окремо до фільтру через штуцер для подачі суспензії не є раціональним, оскільки може вести за собою порушення асептичності процесу через постійне відкриття штуцера.

Також для здійснення даного процесу необхідно забезпечити фільтр подачею стиснутого стерильного повітря для створення всередині апарату необхідного тиску. Для цього є необхідним використання вакуумних насосів. З їх застосуванням можна перекачати під тиском повітря від етапу його очистки на фільтрах індивідуальної очистки. Він працює як компресор, стискаючи повітря до необхідного тиску, у даному випадку – до 0,3 МПа, з

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		132

наступною його подачею у фільтр через вмонтований штуцер. Було обрано такий промисловий насос фірми Value серії VRD з продуктивністю в 16 м³/год [107, 108].

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Будь-яке виробництво повинно забезпечувати повне виконання вимог відповідно до використовуваних апаратів та методів. Зокрема, варто враховувати, що апарати, які працюють при надлишковому тиску мають відповідати вимогам ПБ 10-115-97.

Персонал, який обслуговує апарат, що розглядається, повинен бути обов'язково захищений від небезпечних робочих факторів [109]:

- надлишкового тиску, що створюється у робочому апараті;
- небезпечних значень електричного струму, статичної електрики;
- ризику контамінації патогенного мікроорганізму – мікобактерій бичачого туберкульозу.

Апарат повинен обов'язково відповідати нормам герметичності, що визначається відповідно до ГОСТ 26-11-14. Тиск всередині апарату не повинен бути більшим за встановлений – 0,3 МПа – необхідно запобігати підвищенню його пружинними клапанами прямої дії або запобіжними мембранами апарату або трубопроводів.

Апарат повинен бути встановлений у зоні класу А, що у подальшому забезпечуватиме належний захист персоналу через відповідний спеціальний одяг відповідно до ГОСТ Р 52538-2006, а також знижуватиме ризик контамінації вилученої біомаси після фільтрування. Робоче місце обов'язково повинно бути оснащене джерелами світла, нормальною температурою повітря, вологістю та швидкістю потоку повітря навколо. Стерильність повітря повинна відповідати стандартам ГОСТ Р ИСО 14644-1-2017.

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
						133
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Попередженням захисту атмосфери від викиду є встановлення окремих тканинних, електричних, сітчастих фільтрів, скрубєрів, які звільнятимуть повітря від крапель культуральної рідини з мікроорганізмами. Очищене повітря, після обов'язкової стерилізації надходитиме через трубу розсіювання на викид.

Отриманий рідкий фільтрат, після зливу, надходитиме на обов'язкове знезараження, адже процес фільтрування може мати похибки, що допускають потрапляння мікробних клітин до нього. Мікобактерій туберкульозного комплексу здатні зберігати свої життєві функції у рідкому середовищі, у воді. Тому перед утилізацією у каналізаційних стоках, отриманий фільтрат обов'язково піддаються стерилізації, а також подальшій механічній очистці від компонентів крізь фільтрування, відстоювання, флотацію або очищення з використанням адсорбентів перед остаточним зливом до стоку. Такі процедури знижуватимуть ризик забруднення та контамінації стічних вод.

Фільтрувальна перегородка, після завершення процесу очистки повинна бути простерилізована при 126°C протягом 30 хв, і після перевірки на залишкову контамінацію мікробіологічними методами піддається викиду. Фільтрувальна конструкція повинна оброблюватись обов'язково дезінфікуючими засобами, які будуть знезаражувати зовнішню та, обов'язково внутрішню поверхню після кожного циклу фільтрування. Бажаним є обробка також гарячою парою, як забезпечуватиме остаточну стерильність апарату [79].

Працівники, що виконують роботу саме на етапі очищення біомаси повинні обов'язково перевірятись на інфікування туберкульозом [25].

					ДП 6207. 00.000 ПЗ	Арк.
						134
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВОК

Запропоновано технологію виробництва вакцини БЦЖ-М у ампулах шприцевого наповнення на основі обраного вакцинного субштаму – *Mycobacterium bovis* BCG-1 – для щадної первинної імунізації.

1. Обґрунтовано вибір біологічного агенту – авірулентного російського субштаму *M. bovis* BCG-1, що має високі імуногенні властивості та знижену реактогенність. Розглянуто спосіб отримання генетично стабільної атенуйованої культури продуцента, який передбачає зниження вірулентності шляхом тривалого пасажування на несприятливому картопляно-гліцеринову середовищі з додаванням бичачої жовчі.

2. На основі патентного пошуку, базуючись на розглянутих морфологічних, фізіолого-біохімічних та культуральних особливостях продуцента, запропоновано оптимізацію складу поживного середовища. Технологією передбачено культивування продуцента на модифікованому середовищі Сотона, у якому амінокислота L-аспарагін замінена на амінооцтову кислоту, а лимонна кислота – на амоній лимоннокислий. У якості первинного середовища для отримання посівного матеріалу обрано картопляно-гліцеринове середовище Павловського, склад якого знижуватиме ризик появи додаткових мутацій або реверсії.

3. Удосконалено спосіб проведення виробничого культивування. Для цього промислові ферментери замінені на виробничі колби місткістю 0,5 л. При такому методі культивування створюються умови, що забезпечують суворий контроль якості вакцинного матеріалу за рахунок своєчасного відбраковування некондиційного матеріалу. Оптимальні параметри культивування: температура 38°C, pH=6,5.

					ДП 6207. 00.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВОК			
Розроб.		Левкобська А.В.						
Перевір.		Орядінська Л.Б.						
Керівн.		Орядінська Л.Б.						
Затверд.								
					Літ.	Арк.	Аркушів	
							135	150
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ			

4. Для проведення ефективного відділення вакцинного матеріалу від культуральної рідини обрано фільтр періодичної дії – друк-фільтр – об'ємом 0,002 м³, із мембранною перегородкою з поліетилентетрафталату площею фільтрування 0,012 м². Апарат працює при надлишковому тиску 0,3 МПа, оснащений лопатевою мішалкою з частотою обертів 0,21 с⁻¹. Внутрішній діаметр апарату 0,125 м, висота – 0,37 м. Технологічний та конструктивний розрахунки повістю підтверджують працездатність апарату та відповідають масштабам виробництва.

5. Відповідно до цільового призначення препарату, для зниження реактогенного навантаження у кінцевому продукті зменшено дозу мікобактерій у 0,1 мл розчинника з 0,05 мг на 0,025 мг.

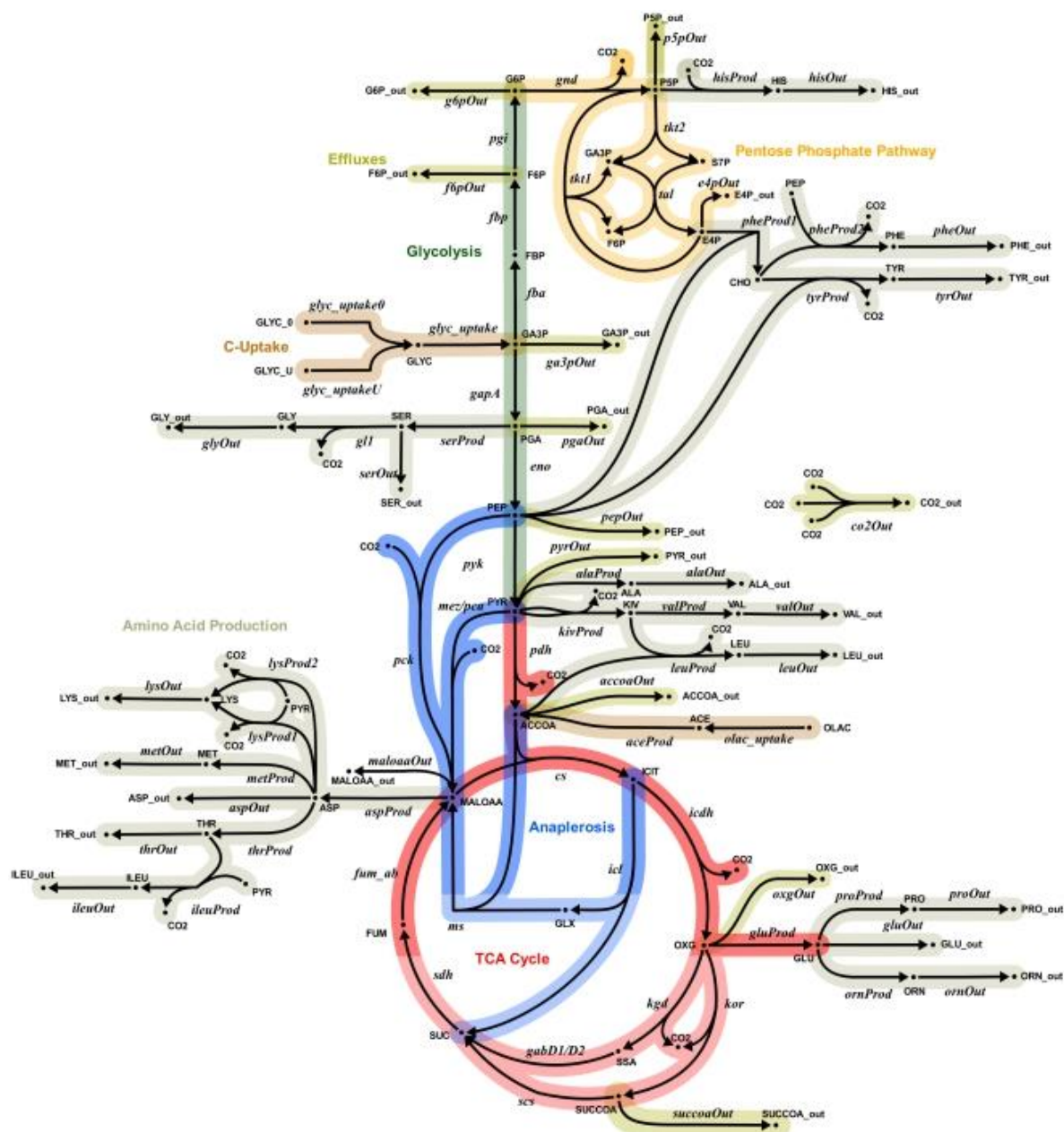
6. Розроблено технологічну та апаратурну схеми виробництва, які дозволяють отримувати високоякісну серійну вакцину БЦЖ для щадної імунізації в ампулах по 20 доз (0,025 мг/доза). Для кожної технологічної стадії складено матеріальний баланс.

7. У роботі зазначено способи захисту працівників, що працюють безпосередньо з біомасою мікобактерій, а також навколишнього середовища від можливого потрапляння живих клітин.

ДОДАТКИ

Додаток А

Метаболічна мережа центрального метаболізму *Mycobacterium bovis* BCG. Гліколіз/глюконеогенез (зелений), пентозофосфатний шлях (оранжовий), цикл трикарбонових кислот (рожевий), анаплеротичні реакції (синій) та біосинтез (сірий) [51]



ДП 6207. 00.000 ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ДОДАТКИ			
Разроб.	Левкоївська А.В.							
Перевір.	Орядінська Л.Б.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ			
Керівн.	Орядінська Л.Б.							
Затверд.								
					Літ.	Арк.	Аркушів	
						149	150	

Генетична карта *M. bovis* BCG Russia 368 [65]

